

LA RECHERCHE
DES AUTO-ANTICORPS ANTINUCLEAIRES
PAR LA TECHNIQUE QUANTITATIVE
D'IMMUNO-FLUORESCENCE

Résultats obtenus par la mise en œuvre
de la réaction sur 400 sérums

THÈSE

présentée

A LA FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 21 Décembre 1961
pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

Anne KRATCHKO

Externe des Hôpitaux de Lyon
née le 7 Août 1936, à Vienne (Isère)

TRAVAIL DU LABORATOIRE D'HYGIENE
DE LA FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE
(Professeur R. SOHIER)



LA RECHERCHE
DES AUTO-ANTICORPS ANTINUCLEAIRES
PAR LA TECHNIQUE QUANTITATIVE
D'IMMUNO-FLUORESCENCE

Résultats obtenus par la mise en œuvre
de la réaction sur 400 sérums



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**LA RECHERCHE
DES AUTO-ANTICORPS ANTINUCLEAIRES
PAR LA TECHNIQUE QUANTITATIVE
D'IMMUNO-FLUORESCENCE**

**Résultats obtenus par la mise en œuvre
de la réaction sur 400 sérums**

THÈSE

présentée

A LA FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 21 Décembre 1961
pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

Anne KRATCHKO

Externe des Hôpitaux de Lyon
née le 7 Août 1936, à Vienne (Isère)

TRAVAIL DU LABORATOIRE D'HYGIENE
DE LA FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE
(Professeur R. SOHIER)



RECHERCHES SUR LA NATURE DE LA LUMIERE
PAR M. H. L. L. L.

LA RECHERCHE
DES AUTOMATISMES INTELLECTUELS
PAR LA TECHNIQUE QUANTITATIVE
CHIMIQUE-FLUORESCENCE
Réglementation relative aux
du 15 Mars 1900



PERSONNEL DE LA FACULTÉ

Doyen honoraire : M. J. LEPINE (membre de l'Institut). Doyen : M. H. HERMANN (corresp. de l'Institut)
Assesseurs : MM. LEVRAT et L. REVOL.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. COLLET, GUIART, PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND, MAZEL, GARIN, GATE,
MARTIN, GABRIELLE, SANTY.

PROFESSEURS

Physiologie	MM. HERMANN	Clinique Chirurgicale C	BERTRAND
Clinique Urologique	CIBERT	Chimie Analytique Pharmaceutique	BADINAND
Physique Biologique	PONTHUS (déta- ché à Beyrouth)	Pharmacie chim. et Pharmacologie	DREVEN
Clinique neuro-psych. et hyg. ment.	DECHAUME	Médecine Légale et Déontologie ..	ROCHE
Thérapeutique chir. et chirur. opér.	ROCHET	Parasitologie et Pathologie Exotiq.	COUDERT
Chimie organique et Toxicologie ..	CHAMBON	Clinique d'Oto-Rhino-Laryngologie et d'Audio-Phonologie	MOUNIER-KUHN
Clinique Chirurgicale B	WERTHEIMER	Clinique Ophtalmologique	PAUFIQUE
Clinique Médicale B	PAUPERT-RAVAULT	Clinique de Dermatologie, Syphili- graphie et Allergologie	THIERS
Clinique et Prophylaxie cardio-vasc.	FROMENT	Clinique de Pneumo-Phtisiologie ..	BRUN
Clinique Médicale C	CROIZAT	Clinique Traumatolog. des membres	CREYSSEL
Chimie biologique et médicale ...	ENSELME	Cancérologie	DARGENT
Clinique Chirurgicale A	MALLET-GUY	Anatomie Pathologique	GUICHARD
Clinique de Chirurgie orthopédique et de Chirurgie Infantile	UILLEMINET	Pathologie Générale et Expériment.	GIRARD Paul
Pharmacie Galénique et Mat. Méd.	REVOL	Anatomie	LATARJET
Clinique Gynécologique	POLLOSSON	Pathologie Chirurgicale	PEYCELON
Clinique Obstétricale	PIGEAUD	Thérapeutique	GIRARD Marcel
Médecine du Travail	BOURRET	Pathologie Médicale	VACHON
Clinique Médicale A	LEVRAT	Physio-Pathologie des voies respirat.	GALY
Hygiène et Action sanit. et sociale.	SOHIER	Histologie et embryologie	KEHL
Clinique Stomatologique	DUCLOS	Radiologie	PAPILLON
Clinique méd. inf. et hyg. du 1 ^{er} âge	BERNHEIM	Clinique des Maladies Infectieuses	JEUNE
Biologie Médicale et Pharmacodyn.	JOURDAN	Hydrologie thérapeutique, climato- logie et Ecologie sociale	GONIN
Botanique et Cryptogamie	NETIEN	Bactériologie	MONNET

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Physique nucléaire appl. à la Médec. BERGER Technologie Pharmaceutique DORCHE

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Obstétrique	MM BANSSILLON	Physiologie	CHATONNET
Parasitologie	ROMAN	Pharmacie et Pharmacologie	CIER André
Bactériologie	BERTOYE	Chimie organique et Toxicologie ..	PERROT
Physiologie	CIER J.-François		

MAITRES DE CONFERENCES-AGREGES

Anatomie pathologique	FEROLDI Jacques	Anatomie pathologique	TOMMASI Michel
Chimie biologique et médicale ..	CREYSSEL Roger	Hygiène	RIFFAT Georges
Anatomie	DUROUX Emile	Pathologie expérimentale	JOUVET Michel
Thérapeutique	BRETTE René	Hématologie	FAVRE-GILLY J.
Histologie	DUMONT Louis	Botanique et cryptogamie	ODDOUX Lucien
Hygiène	THIVOLET Jean	Chimie analytique	MALLEIN René
Parasitologie	GARIN J.-Paul	Chimie biologique	GRAS Jean
Physique	MORET Robert	Physique	PEYRIN Jean-Ol.
Anatomie	BOUCET Alain		

AGREGES EN EXERCICE

Obstétrique	MATHIEU Jacques	Dermatologie	COLOMB Daniel
Orthopédie	MARION Joseph	Médecine légale (chargé d'enseign.)	COLIN Marcel
Médecine générale	GUINET Paul	Médecine du travail	TOLOT François
Médecine générale	PONT Maurice	Neuro Psychiatrie	GUYOTAT Jean
Médecine générale	VIGNON Georges	Neurologie Psychiatrie	SCHOTT Bernard
Médecine générale	REVOL Louis	Obstétrique (chargé d'enseignement)	DUMONT Martial
Médecine générale	PLAUCHU Marcel	Ophtalmologie	BONAMOUR Gges
Médecine générale	TRAEGER Jules	Urologie (chargé d'enseignement)	DURAND Louis
Chirurgie générale	MARION Pierre	Médecine générale	GARDE Alexandre
Chirurgie générale	MICHAUD Pierre	Médecine générale	PERRIN André
Chirurgie générale	JAUBERT DE BEAUJEU	Médecine générale	LARBRE François
Chirurgie générale	SAUTOT Jean	Médecine générale	MORNEX René
Chirurgie générale	GUILLEMIN Gges	Médecine générale	NORMAND Jean
Obstétrique (chargé d'enseignement)	BURTHIAULT R.	Chirurgie générale	MARET Gilbert
Oto-Rhino-Laryngologie	GIRNOUX Marcel	Chirurgie générale	DESCOTES Jacq.
Pédiatrie, puériculture (ch. d'ens)	FRANÇOIS René	Electro-radiologie	CHASSARD J.-L.
Stomatologie	FREIDEL Charles	Neuro-chirurgie	ALLEGRE Georg.
Médecine générale	DEVIC Michel	Ophtalmologie	HUGONNIER René
Médecine générale	DESPIERRES Ch.	Orthopédie	FRAYSSE Robert
Chirurgie générale	DE MOURGUES G.	Oto-rhino-laryngologie	GAILLARD Jean
Chirurgie générale	FRANCILLON J.	Pneumo-phtisiologie	KALB Jean-Claude
Chirurgie générale	SAUBIER Eugène		

EXAMINATEURS DE LA THESE

M. SOHIER, Professeur d'Hygiène. M. H. THIERS, Professeur de Clinique dermato-vénéréologique.
MM. J. TRAEGER, J. THIVOLET, Professeurs Agrégés.

A MON PERE

A MA MERE

A TOUS LES MIENS

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur R. SOHIER

Professeur d'Hygiène à la Faculté de Médecine de Lyon

Membre correspondant de l'Académie de Médecine

Expert de l'O.M.S.

Nous réservant le meilleur accueil dans son Laboratoire, il est pour nous un Maître bienveillant qui sait nous intéresser à notre travail et nous faire profiter de son précieux enseignement.

Nous le remercions très respectueusement du grand honneur qu'il nous fait en acceptant la présidence de cette thèse.

A NOS JUGES

A Monsieur le Professeur H. THIERS
Professeur de Clinique dermato-vénéréologique

Au cours du semestre passé dans son service, il nous a fait bénéficier de l'immensité de son savoir.

Qu'il nous soit permis de l'assurer de notre profonde gratitude et de notre respectueuse fidélité.

A Monsieur le Professeur Agrégé J. TRAEGER
Médecin des Hôpitaux

Il a grandement contribué à l'élaboration de cette thèse en nous confiant aimablement les observations de ses malades. Il nous fait l'honneur d'être notre juge.

Hommages respectueux et reconnaissants.

A Monsieur le Professeur Agrégé J. THIVOLET
Médecin des Hôpitaux

Il nous a inspiré le sujet de ce travail pour lequel il nous a toujours guidée avec patience et bonté, nous faisant profiter de sa grande compétence et nous dispensant son temps sans compter.

Qu'il soit assuré de notre profonde reconnaissance et de notre respectueux attachement.

A NOS MAITRES DANS LES HOPITAUX

Monsieur le Professeur M. LATARJET

Monsieur le Professeur A. TRILLAT

Monsieur le Professeur H. THIERS

Monsieur le Professeur R. PEYCELON

Hommages respectueux.

A NOS MAITRES DE LA FACULTE

Nous tenons à remercier Monsieur le Docteur D. FRIES dont l'aide nous a été précieuse au début de nos expérimentations.

Nous adressons nos sincères remerciements au personnel du Laboratoire d'Hygiène qui nous a aidée dans l'élaboration technique de ce travail et plus particulièrement Mademoiselle Y. CHARDONNET et Mademoiselle N. GUILLON.

Notre plus vive reconnaissance est acquise à Mademoiselle MURAT, Docteur en Pharmacie, pour son importante collaboration dans la préparation des conjugués.

INTRODUCTION

La description par HARGRAVES, RICHMOND et MORTON en 1948 d'anomalies cellulaires rencontrées dans le sang de malades atteints de lupo-érythémato-viscéríte a ouvert la voie à de très nombreux travaux qui ont, peu à peu, permis de préciser la signification de ce « phénomène L.E. ».

HASERICK, LEWIS et BORTZ ont permis de franchir une première étape en 1950 en montrant que le phénomène était du à un facteur sérique actif sur les noyaux. Les travaux de KURNICK ont d'abord conduit à admettre que ce facteur était de nature enzymatique. Mais après que MIESCHER et FAUCONNET (1954) eurent montré que le facteur d'Haserick était absorbé par contact sur des noyaux, MELLORS, ORTEGA et HOLMAN démontrèrent définitivement en 1957 grâce à la technique d'immunofluorescence de COONS et KAPLAN que ce facteur était une gamma globuline et que sa fixation sur les noyaux précédait leur phagocytose chez les malades atteints de lupo-érythémato-viscéríte. La mise au point de différentes techniques permettant de déceler cette gamma globuline à affinité nucléaire permit, dès lors, de rassembler des arguments nombreux appuyant la théorie de la nature immunologique du phénomène. On est passé ainsi de la notion de « facteur » antinucléaire à celle d'« anticorps » antinucléaire, unique ou même multiple, si l'on tient compte de la diversité des réactions utilisées et de leurs résultats souvent divergents.

C'est FRIOU, FINCH et DETRE qui, en 1957, réussirent les premiers à utiliser la technique de Coons indirecte pour rechercher ces anticorps antinucléaires. Des coupes de tissus humains ou animaux exposés à l'action de sérums de malades atteints de lupo-érythémato-viscéríte puis à celle d'antiglobulines humaines marquées par l'isocyanate de fluoresceine présentaient ainsi une intense fluorescence au niveau des seuls noyaux. Seuls les sérums de lupo-érythémato-viscéríte et de quelques cas d'arthrite rhumatoïde réagissaient positivement tandis que les autres sérums testés restaient négatifs.

Ces observations ont été confirmées rapidement par HOLBOROW, WEIR et JOHNSON (1957), HOLMAN et KUNKEL (1957), BARDAWIL et col. (1958), ALEXANDER et DUTHIE (1958). L'intérêt suscité par cette technique augmenta rapidement et en 1960 ALEXANDER, BREMMER et DUTHIE purent rapporter une statistique de 1.116 sérums ainsi étudiés.

Le souhait émis par Monsieur le Docteur TRAEGER de posséder un test de dépistage des formes rénales de la lupo-érythémato-viscéríte plus satisfaisant que la classique recherche du phénomène L.E. nous a incités à la fin de 1960 à mettre en œuvre la recherche des anticorps antinucléaires par cette nouvelle technique. Nous exploitons ainsi la mise au point réalisée depuis le début de 1960 de la méthode d'immunofluorescence de COONS et KAPLAN au Laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Médecine de LYON (Professeur SOHIER).

Les premiers résultats assez facilement obtenus en collaboration avec D. FRIES nous ont encouragés à persévérer dans cette voie.

C'est ainsi que nous apportons aujourd'hui un essai modeste, après les importants travaux étrangers évoqués cidessus, de la technique de recherche des auto-anticorps antinucléaires par immunofluorescence.

Nous envisagerons successivement :

— Les aspects techniques de recherche des auto-anticorps antinucléaires par immunofluorescence. Nous préciserons à ce propos la technique standard utilisée par nous et les résultats de tentatives que nous avons faites pour en fixer certains points.

— Les résultats cliniques obtenus que nous comparerons à ceux d'autres auteurs par la même réaction et par d'autres techniques.

— La signification des auto-anticorps antinucléaires telle qu'elle peut être dégagée actuellement.

CHAPITRE I

Aspects techniques de la recherche des auto-anticorps antinucléaires par immunofluorescence

I. — RAPPEL DES DIVERSES TECHNIQUES PROPOSEES.

Nous allons passer en revue les diverses techniques qui ont pour dénominateur commun d'utiliser la méthode indirecte de COONS pour révéler la fixation sur des matériaux nucléaires d'anticorps antinucléaires. Ces techniques diffèrent donc essentiellement par la qualité du matériau nucléaire utilisé ou par la forme sous laquelle il se présente.

On a donc à faire à deux grands groupes de techniques :

- celles utilisant des noyaux entiers
- celles utilisant des fractions nucléaires.

On doit également opposer les techniques purement qualitatives et les techniques quantitatives.

A. TECHNIQUES UTILISANT DES NOYAUX ENTIERES.

Les noyaux peuvent être obtenus soit sur coupes soit sur frottis.

1) Coupes de tissus.

Les différents auteurs qui ont utilisé ces techniques se sont adressés à de nombreuses variétés de tissus de mammifères.

GOODMAN (26) a employé le foie de souris, alors qu'HIJMANS (33) et HOLBOROW (34, 36) ont travaillé sur des coupes de thyroïde humaine.

BERCK (8) a pratiqué ces réactions sur coupes de foie de rat. C'est sur coupes de rein de ce même animal que MANDEMA (44) a fait ses premières expérimentation.

FRIOU (23) a expérimenté diverses variétés de coupes d'organes : foie et rate de souris albinos, rat, cobayes, lapin.

2) Frottis.

Après ses premiers essais sur coupes d'organes, FRIOU a également essayé avec succès les frottis de sang de poisson (carpe) mais en définitive il a donné la préférence aux suspensions de noyaux de thymus de veau isolés selon la technique d'ALLFREY.

Les étalements de sang humain ont été également l'objet de plusieurs expérimentations que ce soient celles d'HIJMANS, ou celles de CALABRERI (13) et surtout d'ALEXANDER (3) qui a utilisé ce matériel de façon systématique et a publié d'importants résultats obtenus avec cette méthode.

Les frottis de muqueuse buccale que MANDEMA recommande comme plus sensibles que les coupes de rein ne semblent pas à notre connaissance avoir été l'objet d'autres publications.

B) TECHNIQUES UTILISANT DES FRACTIONS NUCLEAIRES.

L'utilisation des fractions nucléaires est d'un intérêt évident, car outre qu'elle a permis de déterminer par la méthode d'immunofluorescence la nature du constituant nucléaire qui est le support de l'antigénicité, elle se prête également à des applications pratiques. C'est ainsi que FRIOU a montré que l'extraction des frottis cellulaires par l'eau distillée ou par une solution de Na Cl 1M, supprime la coloration pour les sérums positifs alors qu'une extraction par une solution de Na Cl 0,15 M la laisse persister.

Rapprochant ce fait des caractères de solubilité des histones, il a pu obtenir des résultats positifs en utilisant comme antigènes des frottis sur lame de solutions de désoxyribonucléoprotéine (nucléo-histone) et il a proposé l'utilisation pratique de ce « spot test ». Après lui, CRAWFORD et ses Collaborateurs (17) ont confirmé l'intérêt pratique de cette variante technique.

La réaction peut, en effet, être exécutée très simplement en déposant sur des lames microscopiques ordinaires une goutte de la solution de nucléo-histone qu'on fixe, après séchage, par l'acétone. On fait alors agir successivement comme d'habitude, le sérum à tester, puis après lavage, l'antiglobuline marquée. La lecture peut se faire en plaçant simplement la lame dans le champ d'une lampe à ultra-violets (lampe à lumière de Wood). Dans les cas positifs la goutte traitée par le sérum est le siège d'une fluorescence nette. Cette simplicité est évidemment très séduisante, mais l'on comprend aisément que cette technique ne puisse donner les mêmes garanties que celle qui comporte l'observation microscopique des noyaux et CRAWFORD lui-même ne la propose que comme « screening test ».

C) TECHNIQUE QUALITATIVE ET TECHNIQUE QUANTITATIVE.

Quelques soient les variantes envisagées à l'instant, elles peuvent donner lieu à l'utilisation soit qualitative, chaque sérum étant alors testé à l'état pur sans dilution préalable, soit quantitative en procédant à l'expertise parallèle du sérum et d'un certain nombre de ses dilutions. La très grande majorité des travaux publiés jusqu'ici à notre connaissance fait état de résultats qualitatifs. Les tests quantitatifs ont surtout été exposés par ALEXANDER et Collaborateurs, MANDEMA et POLLAK.

Nous verrons la nécessité quasi absolue dans laquelle on se trouve actuellement d'utiliser un test quantitatif, si l'on veut utiliser à fond les renseignements fournis par la détection des anticorps antinucléaires par la technique d'immunofluorescence.

II. — TECHNIQUE PERSONNELLE UTILISEE.

Principe général.

Le principe fondamental de la technique d'immuno-fluorescence a été développé par COONS et KAPLAN en 1950 (16). Il s'agit d'une mise en évidence optique d'un complexe immunologique par couplage chimique de l'anticorps avec un fluorochrome.

Nous employons la technique indirecte à deux couches.

Dans un premier temps on fait agir le sérum à tester sur l'antigène. Si le sérum contient des anticorps contre cet antigène, ceux-ci forment avec l'antigène un complexe antigène-anticorps.

Dans un deuxième temps on fait agir un sérum anti-gamma globuline couplé avec le colorant. Les anti-anticorps fluorescents vont se fixer sur l'antigène qui apparaît donc fluorescent.

Dans notre cas particulier l'antigène utilisé est évidemment un matériel nucléaire et ce dernier apparaît donc fluorescent à la lecture si le sérum à tester contient des anticorps antinucléaires.

Nous étudierons donc :

I. — Les différents réactifs entrant en jeu dans la réaction.

- 1) Le matériel nucléaire utilisé avec ses différentes modalités de prélèvement et d'utilisation.
- 2) Le sérum à tester.
- 3) Le sérum anti-gamma globuline ou conjugué fluorescent.

II. — La mise en œuvre de la réaction.

III. — La lecture et l'interprétation des résultats.

- 1) Etude du matériel optique.
- 2) Interprétation des résultats.

IV. — Les variations que peut subir la réaction en fonction des modifications que l'on peut apporter aux différents réactifs.

I. — LES DIFFERENTS REACTIFS ENTRANT EN JEU DANS LA REACTION.

I. — Le matériel nucléaire.

Le problème essentiel qui se pose en pratique est celui du choix du matériel nucléaire. Il est en effet nécessaire de lui réunir plusieurs exigences simples : richesse en noyaux pour faciliter la lecture, morphologie caractéristique, régularité dans la qualité pour obtenir une

reproductibilité satisfaisante des réactions, et enfin obtention et maniement facile.

Nos études ont d'abord porté sur le foie de souris.

A) LES COUPES DE FOIE DE SOURIS.

Prélèvement et utilisation.

Le foie est prélevé sur l'animal narcosé. Il est immédiatement congelé et conservé à -70°C s'il n'est pas utilisé le jour même.

Les coupes, de 4 microns d'épaisseur se font dans un cryostat. (*)

Nous avons utilisé la fixation, soit par l'alcool éthylique à 95° , soit par l'acétone absolu, ceci pendant 10 minutes, après séchage de la coupe à l'air pendant trente minutes.

Le procédé qui utilise l'alcool semble donner des résultats plus satisfaisants avec une morphologie bien conservée et une fluorescence parasite moins importante.

Les coupes sont utilisées soit le jour même, soit conservées à $+4^{\circ}\text{C}$ en boîte étanche. La conservation doit être de courte durée et ne pas dépasser 5 jours pour obtenir des résultats valables.

L'emploi des coupes de foie de souris donne des résultats très satisfaisants mais nécessite un matériel complexe et des manipulations délicates c'est pourquoi, nous avons alors essayé les frottis de sang déjà utilisés par ALEXANDER et qu'HIJMANS recommande également.

B) LES ETALEMENTS DE SANG.

Le sang, en effet, réunit toutes les qualités que l'on peut souhaiter : richesse, morphologie facilement identifiable, obtention simple ne nécessitant aucun matériel particulier.

Pour nos expérimentations, nous avons utilisé des sangs de deux origines :

- sang humain
- sang de souris.

1) Sang humain.

Nous avons utilisé du sang du groupe A1 et groupe O sans pour cela noter la moindre différence dans nos résultats.

Modes de prélèvement.

La prise de sang par **piqûre du doigt** ne nous paraît pas être, pour différentes raisons, la technique idéale. Il est, en effet, difficile par ce procédé de prélever une quantité suffisante de sang pour obtenir un

(*) Nous utilisons le microtome YOUNG dans une chambre cryostatique HARRIS.

nombre important de lames et surtout le sang paraît souillé par des cellules épidermiques, ce qui nuit à la qualité de l'étalement et rend plus délicate la lecture et l'interprétation.

La ponction veineuse que nous avons alors utilisée s'avère beaucoup plus pratique. Celle-ci doit se faire sur anticoagulant.

Le **citrate de sodium** perturbe totalement la réaction en altérant la structure et l'antigénicité nucléaire des leucocytes. Nous avons donc rejeté ce procédé.

L'héparine n'a pas été retenue car les étalements ainsi constitués ont parfois une sensibilité inégale.

La **défibrination** par agitation sur billes de verre pendant 5 minutes est le procédé que nous avons utilisé. Il nous semble qu'il soit peu traumatisant pour la structure leucocytaire et permet de faire des étalements très nets. Du reste si l'on en croit WEIR et Coll. un léger traumatisme favoriserait la fixation des anticorps antinucléaires sur les noyaux.

L'étalement se fait de façon très simple sur une lame porte-objet avec une lamelle ou une lame rodée. Il n'est pas nécessaire de faire des étalements très épais mais ils doivent être très réguliers. Les étalements sont séchés à l'air à la température de la pièce au moins une heure avant l'emploi, car un temps de séchage moins long paraît ne pas permettre une fixation suffisante des éléments figurés du sang qui ont, alors, tendance à se décoller lors du contact du sérum.

La fixation des étalements.

Nous avons essayé la fixation immédiate après l'étalement soit par l'alcool éthylique à 95°, soit par l'acétone, ceci pendant 10 minutes. Nous n'avons, par la suite, pas jugé utile de fixer nos lames par ces procédés qui altèrent la morphologie des leucocytes, le séchage à l'air des étalements nous donnant des résultats plus satisfaisants.

La conservation des étalements.

Tous les auteurs et notamment ALEXANDER qui ont utilisé les étalements de sang humain utilisent les lames le jour même. En pratique, nous n'avons travaillé que sur des étalements frais, mais nous avons essayé de contrôler systématiquement le temps de conservation.

Les lames étaient conservées indifféremment à -20°C ou -50°C . Nous avons travaillé avec un même sérum à titre connu et nous l'avons passé chaque jour en dilutions successives sur des lames conservées.

Les deux premiers jours de la conservation ce titre n'a pas varié ; au troisième jour, on assiste à une baisse non du titre mais de l'intensité de la fluorescence nucléaire pour la dilution la plus élevée et à une altération de la morphologie leucocytaire. Au cinquième jour le

titre du sérum lui-même baisse et la lecture présente de grosses difficultés.

Nous n'avons jamais attribué de valeur à une réaction effectuée sur lame conservée, même lorsque notre sérum témoin positif de référence paraissait nous donner une réaction valable.

2) Sang de souris.

D'obtention très facile par simple section de la queue de l'animal le sang de souris est étalé et utilisé dans les mêmes conditions que le sang humain.

II. Le sérum.

Il est obtenu de façon simple par ponction veineuse. Les sérums ont été utilisés généralement le jour même du prélèvement ou conservés à -20°C . Nous retestons systématiquement des sérums conservés depuis plusieurs semaines et même plusieurs mois. Nous n'avons pas noté de discordance dans nos résultats et nous avons toujours retrouvé le même titre dans le cas de sérums positifs. Cette conservation n'est parfaite que pour le sérum pur. Le sérum dilué ne paraît, lui, au contraire, pas conserver ses propriétés.

Nos sérums ont été employés purs et en dilutions : $1/8$, $1/64$, $1/512$, $1/1.024$, $1/2.048$, $1/4.096$. Cette échelle est celle qu'utilise ALEXANDER. MANDEMA l'emploie également mais avec des dilutions intermédiaires. Nous l'avons adoptée pour faciliter la comparaison de nos résultats avec ceux obtenus par ces auteurs.

Les dilutions ont été pratiquées en eau physiologique tamponnée à pH 7.

III. Le conjugué fluorescent.

Le conjugué fluorescent utilisé pour toutes nos investigations était du sérum de lapins anti-gamma globulines humaines préparé au laboratoire.

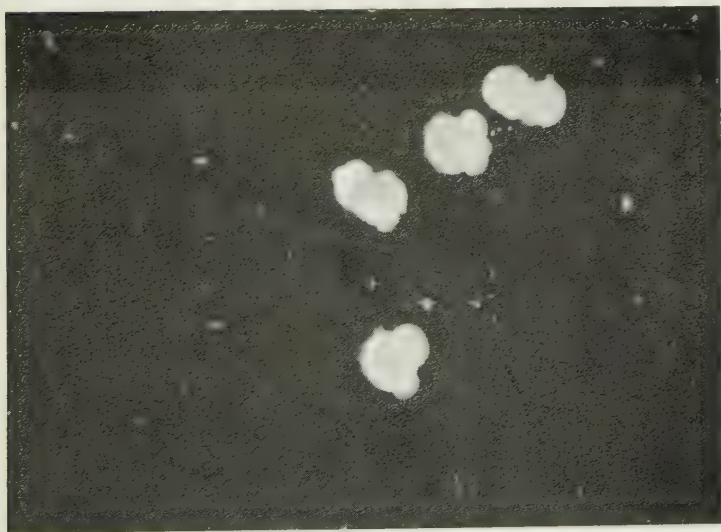
Immunisation des animaux.

Les animaux subissent deux injections I.M. de gamma-globulines humaines (Institut MERIEUX) mélangées à l'adjuvant de Freund. Chaque injection, pratiquée en cinq points différents, contient 50 mg de protéines.

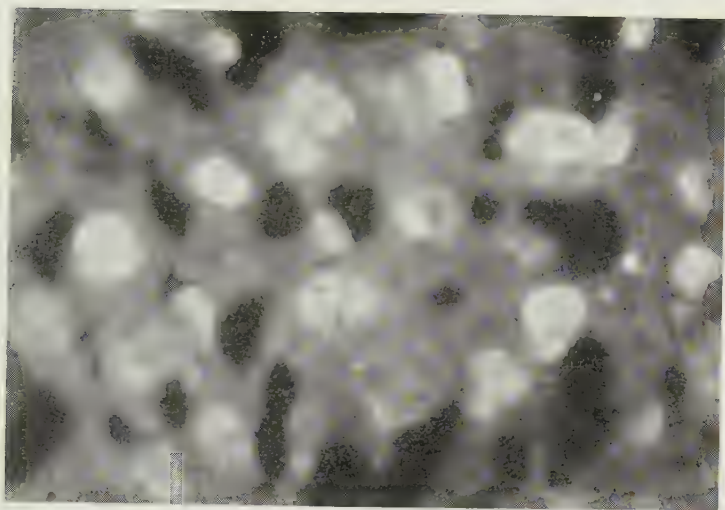
Les lapins sont saignés 3, 5, 7 semaines après la dernière injection. Leur sérum est alors titré pour déterminer la quantité d'antiglobulines, soit par une méthode de Ring-Test soit par une méthode de précipitation à anticorps constant recommandée par COCHRANE.



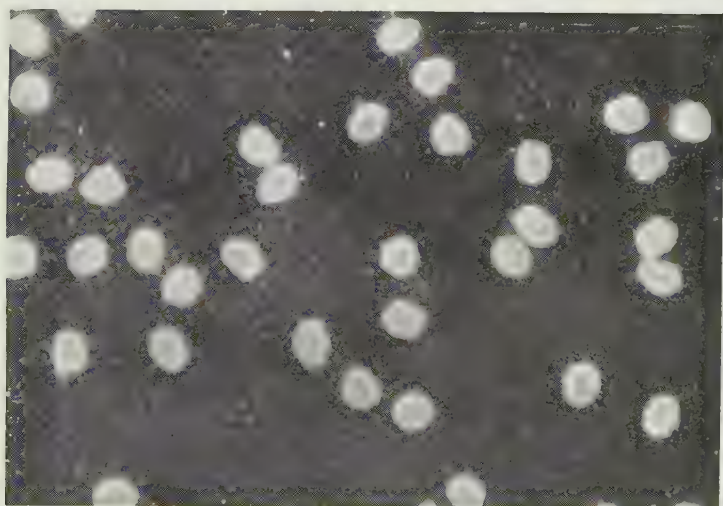
ETALEMENT DE SANG HUMAIN TRAITE PAR UN SERUM POSITIF.
SEULS LES NOYAUX LEUCOCYTAIRES APPARAISSENT FLUORESCENTS.



ETALEMENT DE SANG DE SOURIS. ON RECONNAIT LA POLYSEGMENTATION
CARACTERISTIQUE DU POLYNUCLEAIRE DE SOURIS.



COUPLS DE FOIE DE SOURIS



ETALLEMENT DE SANG DE RASCASSE LES NOYAUX DES HEMATIES APPARAISSENT TOUS FLUORESCENTS.

Lorsque le titre en anti-globulines est jugé suffisant le sérum est alors conjugué avec l'isothiocyanate de fluorescéine.

Technique de conjugaison.

A été étudiée en détail par D. GROSPIRON (28).

Technique complexe comprenant plusieurs étapes :

— Concentration des anticorps par précipitation de la fraction gamma-globulinique pure : fractionnement par le sulfate d'ammonium.

— Dialyse de la solution globulinique et détermination de son taux d'azote.

— Conjugaison avec le fluorochrome. Nous avons employé l'isothiocyanate de fluorescéine.

Absorption du conjugué.

Tous les auteurs qui ont appliqué la technique d'immunofluorescence, dans quelque domaine que ce soit, ont toujours absorbé leur conjugué sur poudres d'organe pour éliminer la fluorescence parasite et non spécifique. JOHNSON (41) recommande cette absorption sur poudres d'organe.

Dans le domaine de la recherche des facteurs antinucléaires tous les expérimentateurs l'emploient.

Si pour les coupes de foie cette absorption du conjugué s'impose en toute nécessité, il n'en est pas de même pour les étalements sanguins. La fluorescence parasite non spécifique est, en effet limitée avec cet antigène à certains protoplasmes leucocytaires et l'interprétation des résultats n'en est qu'exceptionnellement perturbée. Néanmoins cette absorption doit être systématique. Elle semble améliorer encore les résultats.

Toutes nos absorptions ont été pratiquées sur poudre de foie de lapin préparée selon la technique de MELLORS par extraction à l'acétone.

Le contact de la poudre et du conjugué fluorescent est maintenu pendant 1 h. sur agitateur. Une centrifugation de 12.000 tours/minute pendant 30 minutes est alors nécessaire pour obtenir un conjugué parfaitement clair (centrifugeuse Servall réfrigérée).

II. — MISE EN ŒUVRE DE LA REACTION.

Premier temps de la réaction : Mise en contact du sérum à tester avec le matériel nucléaire.

Sur chaque étalement de sang, on délimite, au diamant, deux aires circulaires. Il est nécessaire de nettoyer soigneusement la partie intermédiaire de la lame pour éviter la diffusion des sérums.

Une goutte de sérum à tester, pur et en dilutions successives, est déposée sur chaque surface ainsi marquée.

Le contact est maintenu pendant 40 minutes à + 37°C en chambre humide. Les lames sont disposées dans une boîte de Petri au fond recouvert d'un papier filtre humide pour éviter l'évaporation.

Le temps de contact terminé, on rince l'excès de sérum et les lames sont lavées 10 minutes dans de l'eau physiologique tamponnée à pH 7.

Après un essuyage soigneux des lames qui évite les aires de contact intervient **le deuxième temps de la réaction** : Fixation des antiglobulines fluorescentes. Une goutte de conjugué fluorescent est déposée sur les étalements et maintenu durant 30 minutes à la température de la pièce (18° à 20°C) dans les mêmes conditions que pour les sérums.

Le lavage et l'essuyage s'effectuent alors de la même façon.

Une lamelle est montée sur chaque préparation avec une goutte de glycérine tamponnée pH 7.

III. — **LECTURE ET INTERPRETATION.**

1) **Le matériel optique.**

La pratique de l'immuno fluorescence nécessite un matériel optique particulier.

Nous utilisons un microscope à fond noir standard avec dispositif monoculaire, excité par une source lumineuse à ultra-violets. Celle-ci doit être de grande intensité et très riche en rayonnements ultra-violets.

Personnellement nous employons une lampe OSRAM avec un brûleur HB 0 200 à vapeur de mercure. Le brûleur est monté dans une cage ZEISS.

Trois filtres sont nécessaires :

Un filtre anticalorique : KG 1 ZEISS

Un filtre d'excitation : BG 12 ZEISS placé entre le système calorique et le microscope.

Un filtre protecteur dit d'arrêt : OG 1 ZEISS.

Les photographies ont été faites sur :

Films Super Anscochrome pour les photographies en couleurs et Ilford H.P.S. pour celles en noir et blanc.

2) **Interprétation des résultats.**

RESULTAT NEGATIF.

Les préparations traitées par un sérum négatif, ne contenant donc pas d'anticorps anti-nucléaires, révèlent à la lecture un fond noir où l'on distingue, plus ou moins facilement, les hématies et où les leucocytes se détachent de façon très nette. Le protoplasme apparaît

légèrement fluorescent alors que le noyau s'inscrit au milieu véritablement en négatif.

La fluorescence du protoplasme peut être plus ou moins importante. Elle semble nous l'avons vu, diminuée par l'absorption du conjugué sur poudres d'organe.

RESULTAT POSITIF.

Si la préparation a été traitée par un sérum positif, contenant donc des anticorps antinucléaires, les noyaux leucocytaires apparaissent fluorescents, d'un jaune vert plus ou moins intense.

La morphologie nucléaire est la plupart du temps caractéristique et intacte avec un noyau fluorescent dans sa totalité. Mais nous avons noté, étant en ceci en accord avec BECK un aspect un peu granité du noyau. Cette structure a été observée dans nos expériences dans deux cas précis : pour des dilutions élevées de sérum ou pour des sérums faiblement positifs.

Il est bien certain qu'il est bien difficile de chiffrer la fluorescence nucléaire, étant bien entendu, qu'il s'agit d'une impression totalement subjective. Néanmoins, nous avons adopté une notation en croix admettant + + + + pour la fluorescence nucléaire la plus importante que nous ayons rencontrée et + lorsque le noyau était le moins fluorescent mais où la morphologie était encore facilement reconnaissable.

La dilution la plus élevée qui donne une fluorescence nucléaire encore nette est considérée comme le titre du sérum.

IV. — VARIATIONS DANS LES RESULTATS DE LA REACTION SELON LES MODIFICATIONS DES DIFFERENTS REACTIFS.

Nous envisagerons successivement les deux facteurs qui peuvent entrer en jeu :

1. Les facteurs nucléaires.
2. Les facteurs sériques.

I. — LES FACTEURS NUCLEAIRES

A) Parallèle entre les coupes de foie de souris et le sang humain.

Nos premières expérimentations ont porté sur 75 sérums en utilisant en parallèle ces deux variétés de matériaux.

Nous n'avons jamais noté la moindre discordance dans nos résultats tant du point de vue qualitatif que du point de vue quantitatif.

TABLEAU I

RESULTATS COMPARES OBTENUS SUR COUPES DE FOIE DE SOURIS ET ÉTALEMENTS DE SANG HUMAIN.

TECHNIQUE	METHODE DE COONS INDIRECTE			
ANTIGENE NUCLEAIRE	Coupes de foie de souris		Étalements de sang humain	
NOMBRE DE SERUMS	Testés	Positifs	Testés	Positifs
Lupo-érythémato-viscéríte	9	8	25	20
Dermatomyosite	1	0	3	0
Sclérodermie	1	0	6	0
Périartéríte noueuse	0	0	1	0
Lupus érythémateux	2	0	4	0
Polyarthrite chronique évolutive	10	1	15	5
Néphrite et néphrose	28	0	78	0
Syphilis	0	0	50	0
Maladies diverses	24	0	72	0
TOTAL	75		254	

Nous avons abandonné les coupes de foie de souris au profit des frottis de sang pour des raisons de simplicité technique, le sang, nous l'avons vu, étant d'un maniement plus facile ne nécessitant aucun matériel spécial.

La lecture des étalements de sang nous paraît aussi plus satisfaisante car l'on est beaucoup moins gêné par la fluorescence parasite qui est beaucoup plus importante sur coupes de foie et impose l'absorption du conjugué.

HOLBOROW critique la reproductibilité de la réaction sur étalements sanguins. Personnellement nous ne le croyons pas, tous nos sérums ayant été testés au minimum deux fois, parfois beaucoup plus, sans avoir pour autant rencontré de difficultés. Depuis le début de nos expérimentations nous utilisons dans chacune de nos séries de réaction le même sérum comme témoin positif de référence et son titre n'a jamais varié.

B) Parallèle entre le sang humain et le sang de souris.

Le sang de souris que nous employons actuellement de façon systématique nous paraît un antigène de qualité aussi satisfaisante que le sang humain et même davantage.

Si ce choix a été fait c'est pour différentes raisons :

Raisons mineures mais non négligeables :

- Obtention simple, évitant la prise de sang veineuse chez l'homme
- Reproductibilité parfaite n'obligeant pas à utiliser toujours le même donneur
- Maniement facile.

Mais aussi car à différents points de vue sa qualité nous paraît supérieure.

La richesse leucocytaire nettement plus importante que le sang humain facilitant la lecture et l'interprétation, et surtout des titrages systématiques de sérums pratiqués en parallèle sur sang humain et sur sang de souris tendent à prouver une plus grande sensibilité de ce dernier.

Le tableau II objective le titre obtenu pour différents sérums sur sang humain et sur sang de souris.

TABLEAU II

PARALLELE ENTRE LES TITRES OBTENUS SUR SANG HUMAIN ET SUR SANG DE SOURIS.

N° sérum	Titre sur sang humain	Titre sur sang de souris
K 166	$\frac{1}{1024}$ + —	$\frac{1}{1024}$ ++
K 183	$\frac{1}{1024}$ +++	$\frac{1}{2048}$ + —
K 160	$\frac{1}{8}$ +++	$\frac{1}{8}$ +++++
K 167	$\frac{1}{64}$ +	$\frac{1}{2048}$ +
K 185	$\frac{1}{2048}$ + —	$\frac{1}{1024}$ +

Ainsi le sérum K166 donnant une réaction douteuse pour une dilution de 1/1024 sur sang humain donne une positivité franche à deux + sur sang de souris.

Le K183 négatif sur sang humain à 1/2.048 est positif à ce titre sur sang de souris.

Le K160 en dilution au 1/8 positif à trois + sur sang humain ,à quatre + sur sang de souris.

Le K 167 : titre 1/64 sur sang humain, 1/2.048 sur sang de souris.

Par contre le K 185 positif seulement à 1/1.024 sur sang de souris douteux à 1/2.048 sur sang humain.

De même le phénomène de zone, que nous étudierons plus loin, et que nous avons rencontré pour plusieurs de nos sérums semble se produire avec une moindre fréquence sur le sang de souris.

C'est en considérant ces différents faits que nous avons été amenée à utiliser de façon systématique le sang de souris comme matériel antigénique.

Néanmoins la plupart de nos investigations ont été effectuées en parallèle.

II. LES FACTEURS SERIQUES.

Nous envisagerons ici quelques expérimentations et constatations que nous avons faites tout au long de notre étude.

A) Essai de mise en évidence du rôle favorisant éventuel du complément.

CHIEN LIU (43) a montré à l'occasion de ses travaux sur la mise en évidence des anticorps présents dans le sérum de malades atteints de pneumopathies provoquées par le virus de EATON, que la sensibilité de la technique d'immuno fluorescence indirecte qu'il utilise peut être augmentée dans des proportions notables par l'adjonction aux sérums de sérum humain normal frais ou surtout de sérum de cobaye. Il attribue cet effet à un facteur sérique voisin du complément. Cet effet a été retrouvé par CARSKI (14) dans la technique voisine qu'il utilise pour détecter le « foamy virus » du singe.

Par contre l'adjonction de C' (+) ne modifie pas les résultats obtenus par les mêmes techniques pour les oreillons, la rougeole et l'influenza. Il semble que ce facteur sérique favorise la combinaison antigène-anticorps ; le mode d'action paraît donc tout différent de celui qui est habituel dans les réactions dites de déviation du C'.

Nous avons donc tenté de retrouver cette action favorisante du C'.

— Premier essai.

L'adjonction simple de C' au sérum normal (0,2 ml de C' pour 1,3ml de sérum) n'a modifié en aucune façon nos résultats.

— Deuxième essai.

Nous avons travaillé en utilisant d'une part du sérum normal, d'autre part du sérum chauffé à 56°C pendant 30 minutes.

Nous lui avons ajouté du C' actif et chauffé à 56°C :

0,9 ml. de sérum + 0,1 ml de C' pur puis en dilutions 1/10 et 1/100.

(+) Désormais pour C' lire complément.

Devant l'échec de cette tentative nous avons tenté un

— Troisième essai.

A un sérum chauffé en dilutions successives on a rajouté en proportions égales du C' dilué au 1/5.

Nous n'avons pas non plus noté la moindre différence dans nos résultats. Le titre du sérum n'a pas varié, la dilution finale du sérum nous donnant dans les deux cas une fluorescence chiffrée à deux croix.

Le C' employé était du sérum frais de cobaye.

Nous pensons donc pouvoir conclure que dans la technique de détection des anticorps antinucléaires par immuno-fluorescence on ne retrouve pas l'effet favorisant signalé par LIU dans des conditions analogues pour les anticorps anti-virus de EATON.

B) Le phénomène de zone.

Pour trois sérums positifs nous avons noté une fluorescence beaucoup plus intense pour le sérum en dilution que pour le sérum pur.

TABLEAU III

ETUDE DE L'INTENSITE DE LA FLUORESCENCE SELON LA DILUTION DES SERUMS (PHENOMENE DE ZONE).

Sérum	Fluorescence notée en croix pour les dilutions *				
	Pur	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{512}$	$\frac{1}{1024}$
K 183	+	++	++++	++	++
K 185	+	+++	++++	+	+
K 269	++	++	+++	+	O

Ces constatations appellent quelques commentaires. Le phénomène qui ne se rencontre qu'avec certains sérums de titre élevé semble se rapprocher du classique phénomène de zone. Il faut pourtant noter que l'inhibition paradoxale notée pour le sérum pur ou les premières dilutions ne va habituellement pas jusqu'à l'extinction totale de la fluorescence nucléaire spécifique. On est donc conduit à une appréciation relativement subjective qui enlève une valeur certaine à nos constatations.

C'est ainsi que nous ne pouvons pas considérer comme définitif le fait déjà mentionné que ces phénomènes de zone seraient plus fréquents et plus apparents avec les leucocytes humains qu'avec les leucocytes de souris.

* Voir page 25.

C) Propriété particulières de certains sérums.

Aspect tacheté des noyaux.

Cet aspect déjà noté par BECK (9) sous le nom de « speckled staining » est attribué par cet auteur à un anticorps antinucléaire réagissant avec un constituant défini du noyau.

Personnellement nous avons peu retrouvé ce phénomène mais quand nous l'avons rencontré il s'agissait soit de sérums positifs à titre faible soit pour les dilutions finales de sérums à titre élevé.

Noyau cerclé.

Nous avons remarqué également dans le cas de sérums positifs une bordure du noyau plus fluorescente que la partie centrale. Ce fait a été retrouvé pour plusieurs sérums et noté lors de toutes les réactions effectuées sur ces mêmes sérums. Nous n'avons pas encore pu rattacher ce phénomène à une cause précise.

CHAPITRE II

Application clinique

Nous avons fait faire ce chapitre des réactions obtenues par la mise en œuvre de la réaction précipitante au 46 sérum.

Les expérimentations sur corps de son de serum n'ont porté que sur 71 sérum, nous a démontré que les réactions aux traitements de sang humain et de serum. Comme nous l'avons vu plus haut, nous devons faire attention de sérum que l'on utilise l'un ou l'autre de ces méthodes qui sont.

I — PROVENANCE DES SERUMS.

Les sérum sont provenus de différents catégories de malades des *Coxs Hospitaliers* de LYON, MONTPELLIER, NANCY, STRASBOURG.

Nous avons à mentionner tous les chefs de service qui nous ont rendu de précieux services et les collaborateurs de leurs malades.

MM. les Professeurs RABIN (Montpellier), BARTHÈLEMY, RABREY (Nancy), BRUN, CROZAT, LARRY (Nancy), DECHAUME, FROMENT, GICHARD, JETRE, LEVAT, MATHIAS, REIMAN (Nancy), RAVAILL, THIERI, WIGSON.

MM. les Docteurs DEYR, FAVOUE, GALLON (Montpellier), LEBRE, PELLERAT, PRUMERAS (Nancy), TOUAT, TRACIER et MM. les Chefs de Service de l'Hôpital DESCHENNETTES.

II — RESULTATS.

Nous allons présenter les résultats obtenus par les examens en parallèle avec la technique des sérum précipitants.

La technique des sérum L.E. présentée par d'autres laboratoires réalisés aux *Coxs Hospitaliers* a été faite parallèlement avec les sérum de sérum précipitants.

A) **LES RESULTATS GLOBAUX QUALITATIFS** sont rapportés dans le tableau 4.

L'analyse des différentes catégories d'affections testées montre que, jusqu'à ce jour, trois catégories d'affections, nous ont fourni des résultats positifs :

— **La Lupo-érythémato viscérite.**

Nous avons testé 34 sérums provenant de 20 malades différents. Plusieurs sujets nous ont en effet fourni plusieurs échantillons de sérums, ce qui nous a permis, comme nous le verrons plus loin, d'étudier l'évolution du taux d'anticorps antinucléaires en parallèle avec l'évolution clinique de la maladie.

TABLEAU IV
RESULTATS QUALITATIFS PORTANT SUR 400 SERUMS.

DIAGNOSTIC	Nombre de testés	Nombre de positifs
Lupo - érythémato - viscérite	34	31
Dermatomyosite	4	0
Sclérodermie	6	0
Périartérite noueuse	1	0
Polyarthrite chronique évolutive	25	5
Lupus érythémateux chronique	8	0
Maladie de Chauffard-Still	2	1
Glomérulo - Néphrites et Néphroses	90	0
Rhumatismes divers	20	0
Membres consanguins de L.E.V.	17	0
Syphilis	50	0
Affections virales	50	0
Maladies diverses	93	0
TOTAL	400	

B) RESULTATS QUANTITATIFS POUR LES CAS POSITIFS.

Ils sont rapportés dans le tableau 5. Ils portent sur 15 résultats positifs car pour 2 sérums positifs, le titre n'a pas été recherché.

L'étude du titre des anticorps antinucléaires est d'un précieux enseignement. Si l'on considère la L.E.V. on est frappé par les titres élevés que cette affection confère.

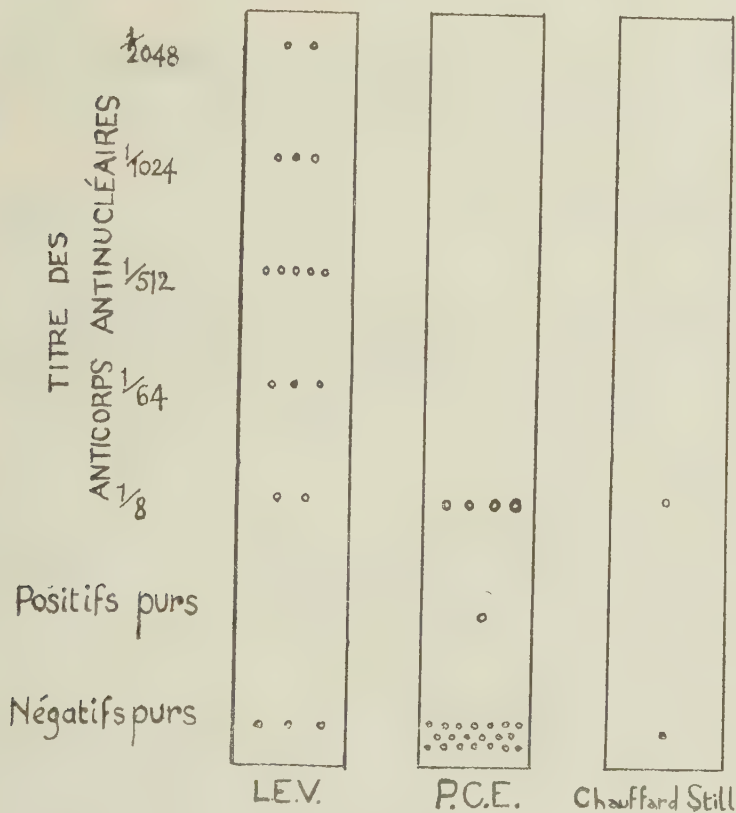


TABLEAU V

RESULTATS QUANTITATIFS — TITRES OBTENUS POUR LES RESULTATS POSITIFS.

Ainsi on observe un titre de :

— 1/2048 pour deux malades : K 166 et K 167

L.E.V. connues et traitées depuis plusieurs mois par le cortancyl ou la nivaquine.

Présence dans ces cas de cellules de Hargraves.

Au moment de l'examen, ces deux malades présentaient une poussée aiguë.

Sur les 20 cas de Lupo-érythémato-viscéríte testés, 17 résultats positifs ont été enregistrés.

Il semble intéressant d'analyser ici les 3 observations des malades où l'on a enregistré un résultat négatif.

Observation N° 1 : K 61.

Femme de 34 ans présentant depuis deux ans un tableau clinique et biologique de L.E.V. (*)

A été traitée d'abord par le cortancyl et la nivaquine. Le quineracyl lui avait été substitué deux mois avant l'examen. A cette époque, malade apparemment guérie. Seule persiste une vitesse de sédimentation légèrement augmentée et une hypéralpha 2 globulinémie à 12 %.

Observation n° 2 : K 63.

Femme de 39 ans présentant un rhumatisme polyarticulaire depuis 13 ans.

Il y a quatre ans apparition d'un lupus érythémateux chronique du visage. Deux ans plus tard pleurésie étiologiquement non définie.

Traitée 8 mois par le cortancyl puis par le quineracyl (3 comprimés par jour). Ce traitement était appliqué depuis 4 mois à l'époque où a été effectuée notre réaction. A noter l'absence de cellules L.E.

Observation N° 3 : K 52.

Affection pluri-viscérale très évolutive aboutissant à un exitus rapide. Il n'a jamais été noté de cellules L.E. et jamais de signes cutanés. Un doute peut dans ce cas persister sur la nature réelle de la maladie, l'autopsie n'ayant pu être pratiquée.

Nous envisagerons l'étude des résultats positifs de L.E.V. lorsque nous étudierons les résultats quantitatifs.

— La Polyarthrite Chronique Evolutive.

Sur les 25 cas traités nous avons trouvé 5 résultats positifs. Notre statistique n'est pas assez importante pour que nous puissions tirer ici une conclusion sur le pourcentage de possibilité de cette affection.

Il est à noter que dans tous les cas positifs il s'agissait de P.C.E. (*) graves, particulièrement évolutives avec parfois association d'atteinte viscérale. Chez une malade on avait même trouvé des cellules L.E. dans le sang.

— La maladie de Chauffard-Still.

Nous n'avons testé que 2 Cas de cette affection, mais nous avons eu un résultat positif chez un enfant de 1 an.

(*) Désormais pour L.E.V. lire Lupo-érythémato-viscéríte.

(*) Pour P.C.E. lire désormais Polyarthrite-Chronique Evolutive.

Parmi toutes les autres affections diverses que nous avons explorées, nous n'avons jamais noté la présence d'anticorps antinucléaires.

— **Maladies du collagène** »

Sclérodermie : 6 cas. Si 3 malades atteints de cette affection ne présentaient pas une affection très évolutive, les 3 autres présentaient une sclérodermie généralisée dont l'un à un stade très avancé de la maladie.

Dermatomyosites : 4 cas de dermatomyosite cliniques typiques confirmées par l'examen biopsique.

1 cas de Périartérite noueuse.

— **Lupus Erythémateux chronique** : Notre étude a porté sur 8 cas. Même chez un malade en poussée aiguë on n'a pas relevé la présence d'anticorps antinucléaires.

— Une très large part a été faite aux **affections rénales** (environ 90) qu'ils s'agissent d'albuminuries isolées, de glomérulo-néphrites aiguës et chroniques ou même de néphroses pures.

— **Rhumatismes divers** : 20 cas.

Spondylarthrite ankylosante, rhumatismes infectieux et dégénératifs.

— **Syphilis**

50 syphilis tertiaires à test de Nelson positifs à titre élevé ont été testés.

— **Affections virales.**

4 gripes. 12 oreillons. 22 pneumonies atypiques primitives. 12 affections à adéno-virus.

— Enfin un très grand nombre de **maladies diverses**. Endocardites infectieuses, Péricardites. Mononucléose infectieuse. Leucopénie essentielle. Maladie de Hodgkin. Myélome. Purpura thrombocytopénique. Polyglobulie. Thyroïdite ligneuse. Hépatite infectieuse. Hépatites évoquant l'hépatite lupique. Amylose. Sclérose en plaques. Pemphigus séborrhéique. Artérite temporale (2 cas). Goutte. Tuberculose ganglionnaire. Maladie de Paget. Cirrhose.

Nous avons par ailleurs essayé de retrouver les résultats de MANDEMA et POLLAK, qui retrouvent 50 % de positivité dans la **parenté consanguine** de malades atteints de L.E.V.

Nous avons ainsi testé 17 personnes provenant de trois familles différentes : les 12 frères et sœurs d'une malade, les parents, le frère et la sœur d'une autre, enfin la sœur d'un de nos malades.

— 1/1024 pour trois malades :

K 26 : malade dont nous avons pu suivre l'évolution. Il sera étudié plus loin.

K 183 : L.E.V. reconnue et traitée.

K 185 : tableau clinique de L.E.V. Les recherches de cellules de Hargraves longtemps négatives étaient positives à l'époque de notre examen. A noter également la présence d'anticorps anti-acide désoxyribonucléique (SELIGMAN, Paris).

— 1/512 : cinq malades :

K 14 : L.E.V. traitée. Cellules L.E. positives.

K 216 : L.E.V. traitée également. Cellules L.E. dans le sang et le liquide pleural. La recherche d'anticorps antinucléaires dans le liquide pleural a été également positive mais seulement dans le liquide pleural pur.

K 223 : Péricardite lupique traitée depuis plusieurs mois.

K 247 : L.E.V. traitée depuis 3 mois par Triamcinolone, ACTH et nivaquine.

K 269 : L.E.V. chez une enfant de 5 ans 1/2. Présence de cellules L.E.

— 1/64 : trois malades :

K 12 : Malade traitée depuis un mois par de fortes doses de corticoides. Evolution très rapide vers l'exitus dans un tableau d'atteinte pluri-viscérale.

K 98 : L.E.V. à début rénal à forme de glomérulonéphrite aigue. Devant l'aggravation du tableau clinique avec urémie élevée (1 gr.), une recherche de cellules de Hargraves s'avère positive ainsi que la recherche des anticorps anti-nucléaires. L'évolution sera étudiée plus loin.

K 230 : L.E.V. traitée depuis 9 mois par les corticoides et le Plaquenil.

— 1/8 : deux cas :

K 12 : L.E.V. traitée. Absence de cellules L.E.

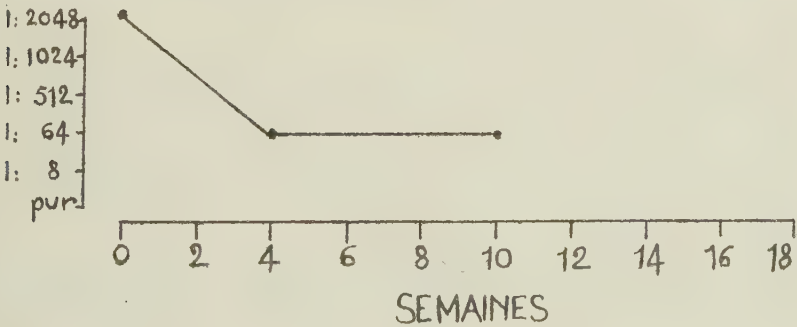
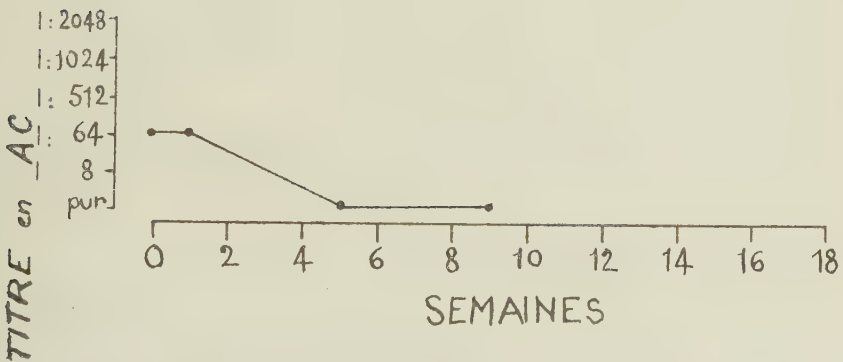
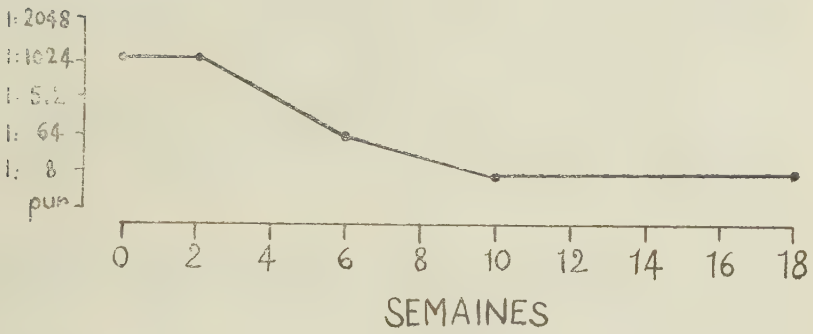
K 60 : L.E.V. diagnostic douteux.

On constate donc que dans la L.E.V. il est fréquent et classique de rencontrer un titre en anticorps élevé atteignant et dépassant la plupart du temps 1/64 ; surtout si l'on considère les autres affections donnant une positivité dans notre réaction (P.C.E., Chauffard Still) où l'on ne constate pas l'existence de titres supérieurs à 1/8.

Il semble donc que dans la L.E.V. en poussée aigue ces titres élevés soient de règle et soient un bon élément de diagnostic lorsqu'on note leur existence.

Par ailleurs, nous avons eu l'avantage de suivre 6 de nos malades et de voir l'évolution de ce titre parallèlement à l'évolution de la maladie.

Pour trois d'entre eux cette évolution est encore trop courte pour que nous puissions en faire état ici.



COURBES OBJECTIVANT LES VARIATIONS DU TITRE EN ANTICORPS (AC)

- **K 26** : M. C... 59 ans. Service du Docteur TRAEGER. Courbe n° 1.
Les deux premiers prélèvements pratiqués à 15 jours d'intervalle montrent l'existence d'anticorps antinucléaires à un titre de 1/1024. Quatre semaines plus tard ce titre devait s'abaisser sous l'influence de la thérapeutique (cortancyl et nivaquine) et n'atteindre que 1/64. Ce titre devait s'abaisser jusqu'à 1/8 30 jours plus tard et s'y maintenir lors du dernier examen 8 semaines après.
A noter la présence de cellules L.E.
Parallèlement l'état clinique était très amélioré et le malade était reparti chez lui, suivant un traitement discontinu : nivaquine, cortancyl.

- **K 98** . Mlle A... 22 ans. Courbe n° 2.
Lors des deux premiers examens : titre de 1/64. Un mois plus tard ce titre s'abaisse et le sérum n'est positif que pur, on note alors une disparition des cellules de Hargraves.
4 semaines plus tard persistance des anticorps antinucléaires dans le sérum pur.
Thérapeutique : cortancyl associé à une décapsulation rénale.

- **K 167** : Mme G... 40 ans. Courbe n° 3.
L.E.V. connue et traitée par la nivaquine.
Titre 1/2048 s'abaissant à 1/64, 6 semaines plus tard et s'y maintenant parallèlement à une amélioration clinique.

III. DISCUSSION DES RESULTATS.

L'étude comparative de nos résultats avec ceux des autres auteurs ayant employé comme nous la technique indirecte de COONS ne manque pas d'intérêt. (Tableau 6).

On constate tout d'abord la positivité à 100 % ou presque que confère la L.E.V. Les résultats de tous les auteurs concordent sur ce point.

C'est dans les autres affections que se dessinent quelques différences. Dans la P.C.E. nous admettons 20 % de positivité. Si ces résultats concordent avec ceux de FRIOU qui leur attribue 10 %, MANDEMA 12 %, WEIR 14 %, nous nous éloignons d'HIJMANS et d'ALEXANDER qui trouvent eux respectivement 41 % et 65 %.

La seule statistique qui fasse état de positivité dans la maladie de Chauffard Still est celle de WEIR qui trouve 13 résultats positifs sur 100 cas testés.

Les résultats obtenus dans les classiques « maladies du collagène » sont eux aussi discordants.

La sclérodermie : FRIOU trouve un résultat positif dans le seul cas testé, ALEXANDER deux sur trois, WEIR 0 sur huit, MANDEMA trois sur dix, alors que nous ne trouvons aucune positivité dans les six cas explorés.

TABLEAU VI
 RESULTATS COMPARÉS DES DIFFÉRENTS AUTEURS AYANT EMPLOYÉ LA TECHNIQUE D'IMMUNO-FLUORESCENCE.

AUTEUR	REACTIF	Nombre de testés positifs		L.E.V.	Scléro- dermie	Dermato myosite	Péri- artériole nouveau-c	P.C.E.	Maladie de Chaulfard Still	Lupus érythémateux chronique	Syndrome de Felty	Parenté consanguine des malades avec L.E.V.	Maladies diverses	Sujets sains
Friou 1958	Thymus de veau			28 27	1 1			42 4					252 2	
Bardawil 1958				5 5	10 9	2 1		8 5					17 0	
Calabresi 1959	Sang humain			15 15			1 0	13 2		2 0	10 10		71 0	
Alexander 1960	Sang humain			12 12	3 2	1 1	3 3	183 119					334 51	580 24
Weir 1961	Thyroïde			63 62	8 0	4 2		132 19	100 13	75 10			270 22	133 2
Hijmans 1961	Thyroïde			62 61	19 3			150 62					406 12	349 0
Mandema 1961	Muqueuse buccale			151 143	10 3	2 0	1 1	17 2				50 24	50 10	40 7
Série personnelle	Sang			34 31	6 0	4 0	1 0	25 5	2 1	8 0		17 0	303 0	

La dermatomyosite : positive chez FRIOU et ALEXANDER pour leur seul cas testé, WEIR deux sur quatre, mais pour MANDEMA aucun résultat positif sur deux malades.

La périartérite noueuse : négative chez CALABRESI, positive à 100 % dans la statistique d'ALEXANDER et MANDEMA.

Enfin le pourcentage de positivité que les différents auteurs reconnaissent dans les maladies diverses est assez variable.

1 % pour FRIOU, 15 % pour ALEXANDER, 12 % chez WEIR, 8 % pour HIJMANS et 20 % chez MANDEMA ;

Chez les sujets sains : 0 % pour HIJMANS, 1,5 % pour WEIR, 4 % pour ALEXANDER et 17 % chez MANDEMA qui note aussi près de 50 % de résultats positifs chez la parenté consanguine de malades atteints de L.E.V.

Ces constatations appellent quelques commentaires. En effet, la nette discordance que l'on peut observer dans les différents résultats peut tenir à des causes différentes.

Que certains auteurs comme MANDEMA et ALEXANDER puissent trouver des résultats positifs chez des malades divers et même chez des sujets sains alors que nous n'avons jamais noté dans ces cas là la présence d'anticorps antinucléaires peut paraître curieux.

— Notre réaction présente-t-elle une spécificité plus grande que celle de ces auteurs ?

On pourrait le penser. Avec les étalements de sang il semble qu'il y ait peu de causes d'erreur, la fluorescence parasite n'étant jamais importante et ne pouvant, semble-t-il pas gêner la lecture et aboutir à des erreurs d'interprétation. Par ailleurs, la morphologie leucocytaire est assez caractéristique pour qu'on la reconnaisse aisément.

— S'agit-il d'une sensibilité moins grande ?

Le fait le plus notable que l'on pourrait invoquer et qui pourrait donner une discordance est la valeur du conjugué fluorescent. Il est fort possible que le titre en antigamma globuline de nos sérums ne soit pas suffisant.

Néanmoins l'existence de titres élevés notés par nous dans la L.E.V. atteignant même 1/2.048 se recoupe bien avec ceux notés par ALEXANDER et MANDEMA qui ont également utilisé la technique quantitative.

ALEXANDER trouve dans la L.E.V. des titres égaux et supérieurs à 1/512 mais ce qui est frappant c'est qu'il retrouve ces titres élevés dans la P.C.E. alors que dans notre cas ces titres ne dépassent jamais le 1/8.

MANDEMA au début de ses expérimentations utilisait des coupes de rein de rat. Il les a abandonnées au profit des frottis de muqueuse buccale qui lui donnaient des résultats plus satisfaisants avec des titres plus élevés atteignant même 1/4.096.

N'a-t-il pas alors trouvé là un matériau nucléaire trop sensible qui ne le mette pas à l'abri des fausses positivités.

Enfin on ne saurait négliger le fait que la même étiquette clinique peut être donnée selon les pays considérés à des manifestations cliniques différentes. C'est le cas en particulier pour la P.C.E. (rheumatoïd arthritis des anglo-saxons), de la maladie de Chauffard-Still, des dermatomyosites, des sclérodermies.

Par ailleurs, certains cas cliniques paraissent d'un classement clinique presque impossible et nous citons l'exemple suivant :

Malade présentant un tableau de P.C.E., mais avec association d'une pleurésie. On note dans le sang la présence de cellules L.E., et un titre en anticorps antinucléaires à 1/8. S'agit-il ici d'une L.E.V. avec un début à type de P.C.E. ou est-ce une polyarthrite avec association d'atteinte séreuse.

IV. — COMPARAISON DE CETTE TECHNIQUE AVEC LES AUTRES TECHNIQUES DE RECHERCHE DES ANTICORPS ANTINU- CLEAIRES

Trois grandes variétés de techniques sont utilisées pour démontrer la présence d'anticorps antinucléaires dans les sérums des malades.

— Les techniques prouvant que les gamma globulines adhèrent aux noyaux. C'est dans cette catégorie que se place notre technique à côté des tests de consommation d'antiglobuline.

— Les réactions de précipitation et de fixation du complément.

— Les méthodes d'agglutination.

Ces méthodes déjà étudiées par SCALETTAR (55) ont été explorées en détail surtout par SELIGMAN (56, 57) dans le cadre des réactions de fixation du complément et de précipitation pour l'acide désoxyribonucléique.

Si l'on envisage les résultats obtenus par SELIGMAN on constate que des résultats positifs ne sont enregistrés que dans la L.E.V. en poussée aiguë alors que les malades traités et en rémission donne des résultats négatifs.

Pour toutes les autres affections explorées on ne trouve aucun résultat positif même dans les maladies du « collagène » ou les P.C.E. même si l'on constate la présence de cellules L.E.

Cette réaction que SELIGMAN recommande pour sa simplicité technique et sa spécificité très grande (elle est en effet limitée exclusivement à la L.E.V.) semble évidemment très séduisante.

La recherche des cellules L.E., classique, elle est aussi d'un grand intérêt mais les difficultés techniques qu'impose sa recherche sont sûrement à l'origine d'un certain nombre d'erreurs.

Par ailleurs il ne semble pas que les enseignements que l'on peut tirer de l'existence des cellules de Hargraves soient aussi intéressants que ceux fournis par la technique de COONS.

Comme nous l'avons vu dans l'étude de nos différents malades nous avons noté dans deux cas, où la L.E.V. clinique ne faisait aucun doute, l'absence de cellules L.E. alors que les anticorps antinucléaires étaient présents.

V. — QUELLE PLACE PEUT PRENDRE LA TECHNIQUE D'IMMUNO- FLUORESCENCE DANS LE DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE PRATIQUE ?

Il semble qu'actuellement on puisse accorder une place de choix à cette technique qui se recommande par sa simplicité, sa reproductibilité, et sa sensibilité.

Le fait que l'on puisse appliquer une réaction quantitative représente sûrement sa plus grande valeur. On peut en effet par la simple étude du titre du sérum en anticorps poser un diagnostic de quasi-certitude de L.E.V. lorsque ce titre atteint 1/64.

Les améliorations techniques, que nous espérons pouvoir lui apporter, augmenteront encore sa sensibilité et nous obtiendrons alors des résultats plus satisfaisants qui se rapprocheront alors peut-être de ceux d'ALEXANDER et MANDEMA.

Nous pensons donc pouvoir conclure que la détection des anticorps antinucléaires par la technique d'Immuno-Fluorescence peut être considérée comme une réaction intéressante dont la valeur diagnostique est indiscutable.

CHAPITRE III

Signification des auto-anticorps antinucléaires

Au début de ce travail nous avons évoqué très rapidement l'enchaînement des travaux qui ont abouti à la conception actuelle des auto-anticorps antinucléaires tandis que se développaient parallèlement les techniques de leur détection.

Il convient maintenant de revenir sur la signification de ces facteurs antinucléaires et d'étudier les différents points suivants :

- S'agit-il de véritables anticorps ?
- Quelle est la nature de l'antigène avec lequel ils réagissent ?
- Sont-ils uniques ou multiples ? Peut-on les différencier d'autres autoanticorps existant conjointement ?
- Interviennent-ils dans le déterminisme des lésions rencontrées en pathologie humaine ?
- Pourquoi et comment se déclenchent ces processus d'autoimmunsation dont ils sont le témoignage ?

Nous nous efforcerons de répondre à ces questions en partant des données de la littérature et pour une part très modeste en fonction de quelques recherches personnelles.

I. — LES FACTEURS ANTINUCLEAIRES

SONT-ILS DES ANTICORPS ?

Nous avons rappelé dans notre introduction que la théorie de la nature enzymatique du phénomène L.E. d'abord soutenue par KURNICK (42) s'est avérée inexacte. On a pu prouver que, contrairement à ce que l'on avait cru tout d'abord, l'acide désoxyribonucléique des noyaux phagocytés au cours du phénomène L.E. n'est pas dépolymérisé.

Par contre, nous l'avons vu, on a démontré que le Facteur L.E. libre dans le sérum est une gammaglobuline. AISENBERG (1) analysant le phénomène L.E. considère que, dans une première phase, les noyaux fixent des gammaglobulines présentes dans le sérum des malades, et que dans une deuxième phase ces noyaux sensibilisés sont phagocytés

en grand nombre par les polynucléaires. A ce stade intervient également une substance qui n'existe que dans le sérum frais, non chauffé. Cette analyse évoque l'action d'un anticorps opsonisant. Et on peut également rapprocher de ceci la chute du taux du complément dans le sang de malades atteints de L.E.V. (COLOMBANI 15).

Divers auteurs et en particulier H. HOLMAN et H.R. DEICHER (38, 39) ont montré qu'on peut révéler les facteurs antinucléaires par diverses techniques immunologiques comprenant la technique d'immuno-fluorescence, la réaction de fixation du complément, la réaction de précipitation, la réaction d'hémagglutination ou d'agglutination de particules de latex sensibilisées, la réaction d'anaphylaxie cutanée passive. Ils concluent que les caractéristiques physiques et immunologiques des facteurs antinucléaires permettent de les classer parmi les globulines anticorps.

GOODMAN et collaborateurs (27) en fractionnant le sérum de malades atteints de L.E.V. sur des colonnes de diéthylaminoéthylcellulose les ont localisées avec précision dans deux fractions globuliniques, lourde (S18), et légère (S6,6) des globulines.

Reste à envisager un point encore mal éclairci celui de la reproduction expérimentale chez l'animal de ces anticorps.

MIESCHER et coll. ont pu faire apparaître chez le cobaye des anticorps antinoyaux et antinucléoprotéine qu'ils ont décelés par déviation du complément, recherche par immuno-fluorescence, anaphylaxie cutanée passive. Mais cette tentative n'a été obtenue qu'après une longue immunisation et le taux d'anticorps ainsi obtenu restait faible. D'autres auteurs par contre n'ont pu obtenir une immunisation contre l'acide désoxyribonucléique purifié (Seligman)

Il semble donc que les facteurs antinucléaires peuvent être considérés comme d'authentiques anticorps, bien que leur production par le système immunitaire d'animaux normaux soit difficile à provoquer.

II. — QUELLE EST LA NATURE DE L'ANTIGENE ?

Cet antigène est évidemment localisé sur les noyaux cellulaires.

On a pu préciser sa nature par trois sortes de travaux utilisant :

- soit la technique sur frottis, sur coupes en faisant varier l'éventail des noyaux utilisés ;
- soit l'action d'enzymes spécifiques, ribonucléase et désoxyribonucléase ;
- soit les essais d'extraction du matériel antigénique.

1) **QUELS NOYAUX SONT ANTIGENIQUES ?**

On peut répondre pratiquement que tous les noyaux de cellules provenant des espèces animales les plus diverses se sont révélés antigéniques.

A) EXPERIMENTATION PERSONNELLE.

Nous avons testés des noyaux provenant :

- de tissus humains : ganglions lymphatiques.
- de tissus animaux : sang de singe, de lapin, de poussin, rein et rate de souris, sang de poissons, sélacien, et de crustacé.
- d'infusoires : paramécies.
- de cellules cultivées en lignée continue.

Nous envisagerons enfin les essais menés sur des spermatozoïdes de lapins.

Les résultats vont maintenant être rapportés.

1) Tissus humains :

Nous avons utilisé un ganglion lymphatique humain prélevé pour examen biopsique. Les coupes ont été pratiquées et utilisées dans les conditions habituelles.

Ce tissu donne des résultats valables qui objectivent bien l'antigénicité de tels noyaux mais on est un peu gêné par une intense fluorescence parasite.

2) Tissus animaux :

a) Sang de lapin.

Obtenu par ponction cardiaque et défibriné de même manière que le sang humain, le sang de lapin ne présente aucune caractéristique particulière. Seuls les leucocytes sont fluorescents.

b) Sang de singe.

Utilisé dans les mêmes conditions il donne les mêmes résultats.

c) Sang de poussin.

Il ne faillit pas à la règle et traité par un sérum positif ses leucocytes apparaissent fluorescents.

d) Les coupes de rein et de rate de souris.

Elles donnent également des résultats intéressants.

e) Etalements de sang de poisson.

Ce qui fait l'intérêt du sang de poisson est l'existence d'hématies nucléées. Les préparations traitées avec un sérum positif présentent donc un fond noir sur lequel on distingue les noyaux des hématies tous fluorescents avec un protoplasme légèrement apparent autour. Les lames ayant mis plusieurs jours à nous parvenir la fluorescence nucléaire n'était pas très intense. Il est probable qu'un étalement utilisé le jour même pourrait donner des résultats beaucoup plus intéressants.

Nous avons ainsi testé le sang de divers poissons :

Boops vulgaris, famille des Sparidés : Saupé
Scorpena corpus, famille des Scorpenidés : Rascasse
Sargus annularis, famille des Sparidés : Spagourin
Mullus, famille des Mullidés : Mulet
Ctenolabrus rupestris, famille des Labridés : Rouquié
Coris julis, famille des Labridés : Girelle

du sang de Sélacien :

Torpedo marmorata, famille des Torpénidés : Torpille

enfin du sang de crustacé :

Carcinus : Crabe.

3) Les paramécies :

Employées en frottis sur lames elles donnent des résultats totalement ininterprétables la fluorescence parasite étant beaucoup trop importante.

Plus intéressante est l'étude de la réaction sur :

4) Cellules cultivées in vitro en lignée continue.

Nous avons utilisé deux catégories de cellules :

Cellules T

Cellules HELA

Les cellules sont cultivées sur tube de BARSKI. Après lavage la lamelle est séchée à + 37°C pendant une heure et utilisée dans les mêmes conditions que l'étalement de sang.

Les cellules traitées par un sérum positif montrent un noyau fluorescent alors que la morphologie caractéristique du protoplasme se distingue très nettement.

Un parallèle entre cellules T, cellules HELA et sang de souris montre.

— Une moindre sensibilité de la cellule T par rapport au sang de souris : le titre d'un même sérum étant 1/1.024 pour le sang et 1/512 pour les cellules T.

Les cellules HELA semblent, elles, encore moins sensibles, le titre du sérum étant dans les mêmes conditions seulement de 1/64.

Néanmoins nous ne pouvons pas poser ici de conclusions définitives nos expérimentations étant trop limitées dans ce domaine.

Les cellules T utilisées sont des cellules de rein humain : souche de VAN DER VEER maintenues en lignée continue au laboratoire depuis 1957.

Les cellules étudiées étaient repiquées depuis deux jours en tube de BARSKI : 100.000 cellules pour 2 ml. de milieu avec du sérum de veau.

Les cellules HELA : cellules de cancer cervical utérin, souche de SYVERTON, maintenues depuis 1956 et ayant au jour de l'examen été repiquées depuis quatre jours à raison de 60.000 cellules pour 2 ml de milieu avec du sérum de poulain.

5) Spermatozoïdes de lapin :

Ils sont obtenus de manière simple par frottis de l'épididyme sur une lame et traités comme les étalements sanguins.

On note une absence d'antigénicité des têtes de spermatozoïdes adultes alors que les cellules plus jeunes de la lignée germinale se comportent comme normalement antigéniques. Cette observation confirme l'observation fondamentale d'HOLBOROW.

Elle est évidemment capitale. Elle ne semble pas du moins à notre connaissance avoir été l'objet de tentatives de confirmation c'est pourquoi nous avons refait l'expérience d'HOLBOROW.

B) COMMENTAIRES.

Le premier point à souligner est le caractère universel de l'antigène nucléaire qui nous intéresse. Ceci est en parfaite concordance avec les résultats déjà acquis en particulier par FRIOU, HOLBOROW, GOODMAN notamment.

Nous regrettons de n'avoir pu obtenir de résultats interprétables avec les paramécies, se situant au bas de l'échelle animale. Par contre la large expérimentation menée avec le sang de diverses espèces de poissons, de sélacien et de crustacé n'a montré aucune différence valable dans l'antigénicité des noyaux de leurs cellules sanguines.

Il semble y avoir pourtant une certaine variabilité dans la sensibilité des antigènes nucléaires. Ceci ressort déjà de comparaisons effectuées notamment par FRIOU.

C'est la raison également de l'utilisation faite par MANDEMA de frottis de muqueuse buccale préférentiellement aux coupes de rein de rat.

Cela ressort de la comparaison entre deux souches de cellules cultivées en lignée continue. On peut remarquer que les cellules HELA sont à l'origine des cellules cancéreuses. Faut-il voir là la raison de la sensibilité moindre de leurs noyaux ?

On ne peut pourtant certainement pas considérer ces résultats — les nôtres comme ceux évoqués — comme définitifs car d'autres facteurs interviennent certainement pour expliquer la réceptivité variable des noyaux aux anticorps.

Par ailleurs, il est bien certain que le comportement de la tête des spermatozoïdes matures est tout à fait frappant. On pourrait objecter à ces résultats la possibilité que la négativité de la réaction soit due à l'épaisse membrane qui entoure la substance nucléaire de telles cellules.

HOLBOROW a d'ailleurs lui-même présenté cette auto-critique, en ajoutant toutefois que les tentatives de traitement préalables des spermatozoïdes en vue de briser cette membrane, par cryolyse ou par les ultra-sons, n'ont pas transformé les résultats.

Nous ferons remarquer également que la même technique d'immunofluorescence utilisée pour mettre en évidence des anticorps anti-

spermatozoïdes a donné des résultats positifs entre les mains d'un collaborateur d'HOLBOROW sur les spermatozoïdes adultes et non sur les formes les plus jeunes de la lignée.

Au total donc ces expérimentations paraissent valables. Elles doivent être rapprochées d'un fait mis en évidence par VENDRELY. Dans les derniers stades de la maturation des spermatozoïdes l'histone qui représentait jusqu'ici la protéine basique du matériel nucléaire se transforme en protamine.

C'est à ce moment que ces noyaux perdent leur antigénicité pour les anticorps antinucléaires et dans la mesure où il semble que les acides nucléiques restent formés d'acide désoxyribonucléique on comprend qu'HOLBOROW conclut que l'antigène nucléaire appliqué dans les réactions est un complexe acide désoxyribonucléique-histone.

On peut ainsi avec la seule technique d'immuno-fluorescence serrer de près le problème de la nature de l'antigène en précisant que tous les complexes D.N.A. histone semblent des antigènes valables.

2) ACTION DES ENZYMES.

L'accord étant fait sur l'antigénicité des noyaux, quel qu'en soit l'origine zoologique, et la réaction apparaissant liée, à la suite des constatations d'HOLBOROW, à la présence d'histone, on pouvait se demander si l'histone seule était antigénique ou si le support du caractère antigénique des noyaux était en fait plus complexe.

On a essayé de vérifier quelle était l'influence des enzymes spécifiquement destructives des acides nucléiques, la désoxyribonucléase et la ribonucléase. BARDAWIL a constaté que le traitement par la désoxyribonucléase seule fait perdre aux noyaux la capacité d'intervenir dans la réaction d'immunofluorescence, c'est-à-dire leur caractère antigénique. FRIOU a obtenu les mêmes résultats sur divers antigènes, alors que la ribonucléase est sans effet.

HOLBOROW confirme ces faits et précise que la désoxyribonucléase n'a plus une action « d'extraction » lorsqu'elle est appliquée après que les noyaux aient subi l'action des sérums antinucléaires et ceci, alors même que dans ces conditions, la coloration de Feulgen est négative. Ceci montre que la présence d'acide désoxyribonucléique est indispensable pour que l'anticorps se fixe sur le noyau mais, que l'anticorps reste fixé ensuite même après destruction de l'acide désoxyribonucléique.

BECK a également retrouvé ces résultats et a même tenté d'aller plus loin dans leur analyse, nous en reparlerons dans le chapitre suivant.

3) EXTRACTION DU MATERIEL ANTIGENIQUE.

Nous ne reviendrons qu'un instant sur les expériences de FRIOU qui sont à la base du « spot-test » qu'il utilise pour la recherche des anticorps antinucléaires. Pour cet auteur, c'est donc bien un complexe D.N.A. histone qui représente l'antigène impliqué dans la réaction que nous étudions.

Mais on peut faire remarquer que les techniques de déviation du complément donnent des résultats positifs en utilisant comme antigène soit de l'acide désoxyribonucléique, soit de l'histone (Seligman). Reste à savoir dans quelle mesure les antigènes utilisés peuvent prétendre représenter strictement l'une ou l'autre de ces substances dont la purification est assez malaisée à réaliser et surtout à contrôler.

Au total il ressort de tous les résultats que nous venons de rappeler et des expériences que nous avons menées personnellement que l'antigène responsable de la réaction de détection des anticorps antinucléaires par immuno-fluorescence est présent dans les noyaux de toutes les nombreuses espèces animales étudiées jusqu'ici et que dans sa constitution entrent en jeu à la fois l'acide désoxyribonucléique et cette protéine basique complexe qu'on appelle l'histone.

III. — UNICITE OU PLURALITE DES ANTICORPS.

Une fois que l'on a admis l'existence d'autoanticorps apparaissant au cours de certaines maladies humaines, le problème se pose de savoir si ces anticorps sont uniques ou si leur mise en évidence par diverses techniques biologiques traduit en fait une pluralité réelle.

En ce qui concerne la lupo-érythémato-viscéríte et les anticorps antinucléaires, on peut actuellement constater, avec prudence les faits suivants :

— Un groupe de techniques très diverses permet de mettre en évidence un phénomène d'immunisation antinucléaire qui survient avant tout chez les malades atteints de L.E.V. et à moindre degré et avec une moindre fréquence dans d'autres affections.

— Le phénomène d'immunisation antinucléaire s'exprime-t-il par un ou plusieurs anticorps ? Il est difficile d'admettre qu'il existe autant d'anticorps que de technique de détection et l'on conçoit que les variations des résultats en pourcentages selon la réaction utilisée puissent s'expliquer par la sensibilité variable de ces techniques.

La seule différenciation précise a été apportée par GOODMAN et coll. qui ont montré que les deux fractions globuliniques lourde S18 et légère S6,6 étaient également capables de contenir des anticorps antinucléaires détectés par immuno-fluorescence alors que, pour les mêmes sérums, seule la fraction légère S6,6 provoquait la formation des cellules L.E.

Ceci confirme et précise les constatations faites par HOLBOROW, FRIOU, AISENBERG, assez résolument dualistes, alors que HALL n'avait pu antérieurement séparer les deux facteurs.

On peut donc dire que l'anticorps antinucléaire et le facteur sérique d'HASERICK sont différents, quoique souvent associés dans les mêmes sérums, et le support globulinique plus large de l'anticorps antinucléaire irait de pair avec la plus grande sensibilité de cette technique appliquée au diagnostic.

Il reste à indiquer qu'on en vient même actuellement à évoquer la possibilité de la multiplicité des anticorps antinucléaires détectés par immuno-fluorescence. BECK a décrit trois aspects morphologiques différents, homogène, tacheté et nucléolaire qui correspondent à trois anticorps différents.

L'aspect « homogène » correspondrait à l'anticorps le plus répandu et à antigénicité universelle. Ces travaux ont été effectués sur coupes de foie. Il ne semble pas qu'on puisse les extrapoler pour tous les matériaux nucléaires.

Nous avons noté exceptionnellement l'aspect tacheté indiqué par BECK et nous pensons qu'il est lié en partie au moins au taux assez faible des anticorps dans le sérum qui le provoque.

Mais il y a là un problème encore mouvant.

IV. — ROLE DES ANTICORPS ANTINUCLEAIRES

DANS LES LESIONS ANATOMIQUES.

C'est un point très controversé. On est tenté d'attribuer à ces anticorps, dont on a vu qu'ils étaient fixés in vivo sur les noyaux des cellules impliquées dans le phénomène L.E. et même au niveau des cellules des lésions rénales (MELLORS et ORTEGA), un rôle actif dans le déterminisme des lésions.

Mais aucune confirmation expérimentale n'a pu être obtenue et même les auteurs qui, comme MIESCHER, ont pu obtenir la production chez l'animal d'anticorps anti-nucléohistone n'ont pas pu déclencher de lésion chez les animaux immunisés avec succès.

Peut-être faut-il une longue maturation avant que se créent les lésions. Il est de fait que le transit des anticorps antinucléaires dans le sang de nouveaux-nés issus de mères malades ne s'accompagne d'aucune manifestation pathologique (BERLYNE et coll. BURMAN et coll.).

Seule la reproduction expérimentale de la maladie pourra trancher le débat dans un sens positif.

V. — MECANISME DE FORMATION DES ANTICORS.

Il n'y a pas là encore et moins qu'ailleurs d'accord sur la nature du processus qui détermine l'auto-immunisation.

Deux sortes d'hypothèses doivent être soulevées.

— Les noyaux pourraient subir une atteinte quelconque augmentant leur pouvoir antigénique pour le propre organisme dont ils sont issus. L'affection serait alors en quelque sorte accidentelle et son processus d'immunisation comparable à celui qu'on connaît au cours du rhumatisme articulaire aigu.

— Mais l'élément anormal peut être recherché, non du côté de l'antigène, mais du côté du système responsable de la fabrication des

anticorps. L'anomalie serait alors intrinsèque chez certains individus qui réagiraient d'une façon qualitativement et quantitativement anormale en face d'agressions antigéniques habituellement sans incidence notable.

En faveur de ce point de vue milite l'existence de cas apparemment familiaux héréditaires de L.E.V. dont Sh. BRUNJES a fait récemment le bilan appuyé surtout sur la recherche des cellules L.E. Les travaux de MANDEMA et POLLAK et MANDEMA reposant, nous l'avons vu, sur la recherche des anticorps antinucléaires par immuno-fluorescence apporteraient, s'ils sont confirmés, un argument décisif, car la sensibilité de la technique qu'ils utilisent leur a permis de déceler des anticorps antinucléaires chez près de la moitié des sujets consanguins de malades même apparemment sains.

C'est la raison pour laquelle nous avons tenté au plus vite une vérification de ces résultats positifs. Nous ne pouvons qu'enregistrer la discordance pour le moment.

Mais c'est un point que nous nous efforcerons à tous prix d'éclaircir dans l'avenir en essayant d'améliorer la sensibilité de notre technique et en élargissant notre champ d'investigation.

CONCLUSIONS

La détection des auto-anticorps antinucléaires par la méthode quantitative d'immunofluorescence a été étudiée dans le but, d'abord de mettre au point une technique pratique utilisable pour le diagnostic biologique courant. Cette mise au point a permis d'étudier un certain nombre de facteurs pouvant influencer la mise en œuvre de la réaction.

L'intérêt pratique des frottis de sang humain et également de sang de souris a été ainsi démontré. L'existence d'un phénomène de zone de faible intensité a pu être décelé.

Par contre on n'a pas retrouvé d'actions favorisantes du complément. La technique proposée a été appliquée à la détection des anticorps antinucléaires sur 400 sérums. Les anticorps ont été décelés par la réaction quantitative pour 31 sérums sur 34 de malades atteints de lupus-érythémato-viscéríte, pour 5 sur 25 de polyarthrite chronique évolutive, enfin dans un cas de maladie de Chauffard-Still.

Le titrage, par la réaction quantitative montre que les taux atteignant ou dépassant 1/64 sont de règle au cours des lupus-érythémato-viscéríte évolutives et qu'ils ne se rencontrent pas avec notre technique au cours des polyarthrites chroniques évolutives.

L'analyse des résultats précise en outre la baisse du titre sous l'influence des traitements et parallèlement à la rémission clinique au cours des lupus-érythémato-viscéríte.

Les résultats de la technique que nous avons utilisée comparés à ceux publiés par d'autres auteurs à l'étranger font apparaître un nombre de résultats positifs inférieurs à ceux de ces auteurs. Les différences pourraient tenir à une sensibilité trop faible de notre technique, mais aussi à une sensibilité dans les méthodes des auteurs étrangers telle qu'elle ne met pas à l'abri des réactions non spécifiques, ce que laisseraient à penser les réactions positives qu'ils ont trouvées chez des sujets apparemment normaux.

En outre, on ne saurait négliger le fait que la même étiquette clinique est donnée selon le pays considéré à des manifestations cliniques différentes.

Sur le plan du diagnostic biologique pratique, la technique paraît se recommander par sa simplicité, sa plus grande reproductibilité et sa plus grande sensibilité que la recherche des cellules de Hargraves.

L'étude de la signification des auto-anticorps antinucléaires permet, en fonction de quelques expériences personnelles (recherche du caractère antigénique de noyaux très variés et en particulier de nombreuses espèces de poissons, sélaciens et de cellules cultivées en lignée continue), et surtout de l'étude des données de la littérature de conclure qu'il s'agit d'un anticorps contre un élément constitutif du noyau assez largement répandu, que l'antigénicité du matériel nucléaire est liée au complexe acide-désoxyribonucléique histone, qu'il est encore difficile de savoir si ces anticorps sont uniques ou multiples ou s'ils se différencient nettement d'anticorps mis en évidence par d'autres techniques, qu'on peut se demander enfin si ces anticorps ne sont pas acquis à la suite d'un désordre héréditaire, bien que le titrage de 17 sérums de sujets consanguins de malades atteints de lupo-érythémato-viscéríte ne nous aient permis de retrouver les résultats de certains auteurs qui sont à la base de cette hypothèse.

Le Président de la Thèse :

Pr SOHIER.

Vu et permis d'imprimer,

LYON, le 2 décembre 1961.

Le Recteur,

Vu, le Doyen :

H. HERMANN.

Président du Conseil de l'Université :

P. LOUIS.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) AISENBERG (Alan C.)
Studies on the mechanism of the lupus erythematosus (L.E.) phenomenon.
J. Clin. Invest. 1959, **38**, 325
- 2) ALEXANDER, DUTHIE.
Reaction of lupus erythematosus serum with nuclei of circulating and no circulating cells.
Brit. Med. J. 1958, **2**, 1565
- 3) ALEXANDER (W.R.M.), BREMMER (J.M.), DUTHIE (J.S.R).
Incidence of the antinuclear factor in human sera
Ann. Rheum. Dis., 1960, **19**, 338
- 4) ANTOGNETTI (D.), MARMONT (A.)
Artrite reumatoide e fattore L.E.
« Artrite reumatoide » Basilea 1961, **89**, 131
- 5) SHERSON (G.L.)
Antibodies against nuclear and cytoplasmic cell constituents in systemic lupus erythematosus and others diseases.
Brit. J. Exp. Path. 1959, **40**, 209
- 6) BALL. (T.)
Serum factor in rheumatoid arthritis agglutinating sensitized sheep red cells.
Lancet, 1950, **2**, 520
- 7) BARDAWIL (W.A.), TOY (B.L.), GALINS (N.), BAYLES (Th. B.)
Disseminated lupus erythematosus, scleroderma and dermatomyositis as manifestations of sensitization to DNA protein.
Am. J. Path. 1958, **34**, 607-629
- 8) BECK (J.)
Variations in the morphological patterns of « Auto-Immune » nuclear fluorescence.
Lancet, 3 juin 1961, 1203
- 9) BERLYNE (G.M.) SHORT (I.A.), VICKERS (C.F.M.)
Placental transmission of the L.E. factor.
Lancet 1957, **22**, 15

- 10) BEUTNER Bacteriological Review 25 n° 1 mars 1961
- 10 bis) BRUNJES Sh., ZIKE K., JULIAN R.
Familial Systemic lupus Erythematosus - A review of the literature with a Report of ten Additionnal Cases in Four Families
Am. J. Med. 1961 **30** 529
- 11) MAC FARLANE BURNET
Auto-Immune disease :
1) Modern Immunological concepts
2) Pathology of the immune response.
Brit. Med. J. 1959, **2**, 645-720
- 12) BYWATERS (E.G.L.)
Antibodies in rheumatism
Proc. Roy. Soc. Med. 1959, **52**, 440
- 13) CALABRESI (P.), EDWARDS (E.A.), SCHILLING (R.F.)
Fluorescent antiglobulin studies in leukopenic and related disorders.
J. Clin. Invest. 1959, **38**, 2091
- 14) CARSKI (T.R.)
A fluorescent antibody study of the Simian foamy agent.
J. Immun. 1960, **84**, 426
- 15) COLOMBANI
Etude du Complément total au cours des diverses hémopathies
Sem. Hop. Paris 1959, **35**, 2632
- 16) COONS A.H. KAPLAN M.H.
J. Exp. Med. 1950 **91**, 1-38
- 17) CRAWFORD (H.J.), WOOD (R.M.), LESSOF (M.H.)
Detection of antibodies by fluorescent spot technique.
Lancet 1959, **2**, 1172-1174
- 18) FRIOU (G.J.), FINCH (S.C.), DETRE (K.D.)
Nuclear localization of a factor from disseminated lupus serum
Federation Proc. 1957, **16**, 13
- 19) FRIOU (G.J.)
Clinical application of lupus serum nucleoprotein reaction using the fluorescent technique.
J. Clin. Invest. 1957, **36**, 890
- 20) FRIOU (G.J.)
Clinical application of a test for lupus globulin-nucleohistone interaction using fluorescent antibody.
Yale J. of Biol. Med. 1958, **31**, 40-47

- 21) FRIOU (G.J.)
Identification of the nuclear component of the interaction of L.E. globulin and nuclei.
J. Immun. 1958, **30**, 476-481
- 22) FRIOU (G.J.)
The significance of the lupus globulin-nucleoprotein reaction
Ann. Internal Med. 1958, **49**, 866-875
- 23) FRIOU (G.J.), FINCH (S.C.), DETRE (K.D.)
Interaction of nuclei and globulin from lupus erythematosus serum demonstrated with fluorescent antibody
J. Immun. 1958, **80**, 324-329
- 24) GAJDUSEK (D.C.)
An auto-immune reaction against human tissue antigen in certain acute and chronic diseases.
A.M.A. Arch. Int. Med. 1958, **101**, 9
- 25) GLYNN (L.E.), HOLBOROW (E.J.), JOHNSON (G.D.)
The distribution of blood-group substances in human gastric and duodenal mucosa.
Lancet 1957, 1088
- 26) GOODMAN (M.C.)
Serum factors in lupus erythematosus and others diseases reacting with cell nuclei and nucleoprotein extracts.
J. Clin. Invest. 1958, **39**, 1595
- 27) GOODMAN (M.C.), FAHEY (J.L.), MALMGREEN (R.A.), BRECHER (G.)
Separation of factors in lupus erythematosus serum reacting with components of cell nuclei.
Lancet 1959, **2**, 382-383
- 28) GROSPIRON (D.)
Thèse Université Pharm.) LYON 1961.
Etude des techniques d'immuno-fluorescence appliquées au diagnostic sérologique des tréponématoses.
- 29) HALL (A.P.), BARDAWILL (W.A.), BAYLES (Th.B.), MEDINS (A.D.), GALINS (Nora)
The relations between the antinuclear, rheumatoid and L.E. cell factors in the systemic rheumatic diseases.
New England J. Med. 20 octobre 1960, 769
- 30) HARGRAVES (M.M.)
Systemic lupus erythematosus and L.E. cell phenomenon.
Mayo Clinic and Mayo Foundation of University of Minnesota post Graduate Medicina, 1954 (Sept.) **16**, N° 3

- 31) HARGRAVES (M.M.), RICHMOND (M.), MORTON (R.)
Presentation of bone marrow elements : the tart cell and the L.E. cell.
Proc. Staff. Meet. Mayo Clinic 1948, **23**, 25
- 32) HASERICK (J.R.), LEWIS (L.A.), BORTZ (D.N.)
Blood factor in acute disseminated L.E. Determination of globulin as specific plasma fraction.
Am. J. Med. Science 1960, **219**, 660
- 33) HIJMANS (W.), DONIACH (D.), ROITT (I.M.), HOLBOROW (E.J.)
Serological overlap between L.E., rheumatoid arthritis and thyroid autoimmune disease.
Brit. Med. J. 1961 , (Oct.) 909
- 33 bis) HIJMANS communication personnelle
- 34) HOLBOROW (E.J.), WEIR (D.M.), JOHNSON (G.D.)
A Serum factor in lupus erythematosus with affinity for tissue nuclei.
Brit. Med. J 1957, **2**, 732-734
- 35) HOLBOROW (E.J.), WEIR (D.M.)
Histone : an essential component for the lupus erythematosus anti-nuclear reaction.
Lancet 1959, **1**, 809
- 36) HOLBOROW (E.J.)
Serum antinuclear factor and auto-immunity
Proc. Roy. Soc. 1960, **53**, 625
- 37) HOLMAN (H.R.), KUNKEL (H.G.)
Affinity between the lupus erythematosus factor and cell nuclei and nucleoprotein
Science 1957, **126**, 162.
- 38) HOLMAN (H.R.), DEICHER (H.), ROBBINS
Antinuclear antibodies in lupus erythematosus
in « mechanism hyper sensitivity » intern. Symposium (DETROIT 1958) Sheffer J.H., Logrippo G.A. and Merrill W. : Chase editors, Little Brown and Co. Publ. 1959, p. 361-9.
- 39) HOLMAN (H.R.), DEICHER (H.R.)
The reaction of the lupus erythematosus (L.E.) cell factor with desoxyribonucleoprotein of the cell nucleus.
J. Clin. Invest. 1959, **38**, 2059
- 40) HOLMAN (H.)
Systemic lupus erythematosus disease of an usual immunologic responsiveness.
Am. J. Med. 1959, **27**, 525

- 41) JOHNSON (G.D.)
Simplified procedure for removing non specific staining components from fluorescein conjugates.
Nature 1961, **191**, N° 4783, 70-71
- 42) KURNICK (N.B.), SCHWARTZ (L.), PARISER (S.), LEE (S.)
Studies on desoxyribonuclease in systemic L.E.
J. Clin. Invest. 1952, **31**, 1036
- 43) LIU CHIEN
Studies on primary atypical pneumonia
J. Exp. Med. Janvier 1961, **113**, 111-123
- 44) MANDEMA (E.), POLLAK (V.E.), KARK (R.M.), REZAIAN (J.)
Quantitative observations on antinuclear factors in systemic lupus erythematosus.
J. Lab. Clin. Med. 1961, **58**, 337
- 45) MARMONT (A.)
Considerazioni sopra alcuni aspetti clinici, diagnostici e terapeutici del lupus eritematoso sistemico.
Medicine internazionale 1957
- 46) MARMONT (A.)
Nucleo phagocytosis L.E. cell phenomenon in systemic lupus erythematosus rheumatoid arthritis and systemic scleroderma.
« Immunopathology Ist International Symposium Basel/Seelisberg 1958 », p. 479-500
- 47) MARMONT (A.), DAMASIO (E.)
Il quadro immunobiologico del lupus eritematoso sistemico con particolare riguardo al fattore L.E.
Immunobiologia delle malattie reumatiche
« Il Pensiero scientifica » ROMA.
- 48) MARSHALL (J.D.), EVELAND (W.C.), SMITH (C.W.)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1958, **98**, 898
- 49) MELLORS (R.C.), ORTEGA (L.G.), HOLMAN (H.R.)
Role of gamma globulins in the pathogenesis of renal lesions in S.L.E. and chronic membranous glomerulonephritis.
J. Exp. Med. 1957, **106**, 191-202
- 50) MIESCHER (P.A.), THOMAS (L.), BENACERRAF (B.), COOPER (N.S.), FRANKLIN (E.), ROTHFIELD (N.)
The immuno-pathology of lupus erythematosus
Brit. J. Dermat. 1960, **72**, 221
- 51) MIESCHER (P.A.), COOPER (N.S.), BENACERRAF (B.)
Experimental production of antinuclear antibodies
J. Immunology Juillet 1960, **27**,

- 52) MIESCHER (P.), FAUCONNET (M.)
L'absorption du facteur L.E. par des noyaux cellulaires.
Experientia (Bâle) **10**, 252
- 53) PEARSE (A.G.E.)
Histochemistry theoretical and applied, 1960
- 54) POLLAK (V.E.), MANDEMA (E.), KARK (R.M.)
Antinuclear factors in the serum of relatives of patients with lupus erythematosus.
Lancet 1960, **2**, 1061
- 55) SCALETTAR (R.), MARCUS (D.M.), SIMONTON (L.A.), MUSCHEL (L.H.)
The nucleoprotein complement fixation test in the diagnosis of systemic lupus erythematosus.
New-England J. Med. 4 août 1960, 226
- 56) SELIGMAN (M.)
Etudes immunobiologiques sur le lupus erythemateux disséminé.
Rev. Franç. Et ; Clin. Biol. 1958, **3**, 558
- 57) SELIGMAN (M.)
Données récentes sur le phénomène L.E. et sur les anticorps du lupus erythemateux disséminé.
Presse Médicale 1961, **69**, 1643
- 58) THIVOLET (J.), FRIES (D.), KRATCHKO (A.)
La détection des facteurs anti-nucléaires par la technique d'Immuno-Fluorescence
Aperçu technique — Premiers résultats cliniques.
Rev. Lyon. Med. n° **16** 30-X-61 10
- 59) VASQUEZ (J.J.), DIXON (F.J.)
Immunohistochemical study of lesions in rheumatic fever, S.L.E. and rheumatoid arthritis.
Lab. Investg. 1957, 205-217.
- 60) VENDRELY (R.), KNOBLOCH (A.), VENDRELY (C.)
Exp. Cell. Res. 1957, **13**, (suppl. 4) 279.
- 61) WEIR (D.M.), HOLBOROW (E.J.), JOHNSON (G.D.)
A clinical study of serum antinuclear factor.
Brit. Med. J. 1^{er} avril 1961, **933**, 7
- 62) WHITE (R.G.), BASS (B.M.), EINAN (W.)
Lymphadenoid goitre and the syndrome of systemic lupus erythematosus.
Lancet 1961, **1**, 368
- 63) WILKINSON (M.), SACKER (L.S.)
The lupus erythematosus cell and its significance.
Brit. Med. J. 1957, **2**, 611.

TABLE DES MATIERES

Introduction	15
--------------------	----

CHAPITRE I

Aspects techniques de la recherche des auto-anticorps antinucléaires par immuno-fluorescence.

I. Rappel des diverses techniques proposées :

— Techniques utilisant des noyaux entiers	17
— Techniques utilisant des fractions nucléaires	18
— Technique qualitative et technique quantitative	18

II. Technique personnelle utilisée :

I. Les différents réactifs 19

— Le matériel nucléaire :

— Coupes de foie de souris	20
— Sang humain	20
— Sang de souris	22

— Le sérum 22

— Le conjugué fluorescent 22

II. Mise en œuvre de la réaction 23

III. Lecture et interprétation 24

IV. Variations de la réaction :

— Facteurs nucléaire :

— Parallèle coupes de souris - sang humain	25
— Parallèle sang humain - sang de souris	26

— Facteurs sériques :

— Rôle du complément	28
— Phénomène de zone	29
— Propriétés particulières des sérums	30

CHAPITRE II

Application clinique.

I. Provenance des sérums	31
II. Résultats	31
— Résultats qualitatifs	32
— Résultats quantitatifs	35
III. Discussion des résultats	38
IV. Comparaison de cette technique avec les autres	41
V. Place de cette technique dans le diagnostic biologique pratique	42

CHAPITRE III

Signification des auto-anticorps antinucléaires.

I. Les facteurs antinucléaires sont-ils des anticorps ?	43
II. Quelle est la nature de l'antigène ? :	
— Quels noyaux sont antigéniques ?	44
— Expérimentation personnelle	45
— Commentaires	47
— Action des Enzymes	48
— Extraction du matériel antigénique	48
III. Unicité ou pluralité	49
IV. Rôle des anticorps antinucléaires dans les lésions anatomiques	50
V. Mécanisme de formation des anticorps	50
Conclusions	53
Bibliographie	55

ACHEVE D'IMPRIMER LE
— 18 DECEMBRE 1961 —

DEPOT LEGAL N° 648
— 4^e TRIMESTRE 1961 —

